

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2018-2019

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)
et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 16 septembre 2019 à POITIERS
par BERTHY Elise

**Impact des polluants pesticides sur l'agressivité et la réponse aux
traitements des glioblastomes**

Composition du jury :

Président : - Monsieur DUPUIS Antoine, Pharmacien, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier, CHU de Poitiers

Membre : - Monsieur ZEMMOURA Ilyess, Neurochirurgien, Maître de Conférences d'Université et Praticien Hospitalier, CHRU de Tours

Directeurs de thèse : - Madame ANDRE Virginie, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHRU de Tours

- Monsieur OLIVIER Christophe, Pharmacien, Maître de Conférences d'Université, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2018-2019

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)
et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE PHARMACIE HOSPITALIERE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 16 septembre 2019 à POITIERS
par BERTHY Elise

**Impact des polluants pesticides sur l'agressivité et la réponse aux
traitements des glioblastomes**

Composition du jury :

Président : - Monsieur DUPUIS Antoine, Pharmacien, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier, CHU de Poitiers

Membre : - Monsieur ZEMMOURA Ilyess, Neurochirurgien, Maître de Conférences d'Université et Praticien Hospitalier, CHRU de Tours

Directeurs de thèse : - Madame ANDRE Virginie, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHRU de Tours

- Monsieur OLIVIER Christophe, Pharmacien, Maître de Conférences d'Université, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

- FREYSSIN Aline

Le Doyen,

Année universitaire 2018 - 2019

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALLAL Joseph, thérapeutique
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie (retraite 09/2019)
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCOA Christophe, bactériologie – virologie
- CARRETIER Michel, chirurgie générale (retraite 09/2019)
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUT Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, oncologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (en détachement)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOU Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie

- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- TOURANI Jean-Marc, oncologie (retraite 09/2019)
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (en détachement)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- COUDROY Rémy, réanimation (en mission 1 an)
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie (en mission 1 an)
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- PALAZZO Paola, neurologie (pas avant janvier 2019)
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe
- GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié
- GAY Julie, professeur agrégé

Professeurs émérites

- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- EUGENE Michel, physiologie (08/2019)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2019)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2020)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (08/2021)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2020)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2021)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONToux Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (ex-émérite)
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

A Monsieur Antoine Dupuis, PU-PH - CHU de Poitiers

Pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, veuillez trouver ici mes sincères remerciements. Je garde un excellent souvenir de mon passage à Poitiers, soutenir ma thèse, ici, en votre présence, me fait particulièrement plaisir.

A Monsieur Ilyess Zemmoura, MCU-PH – CHRU de Tours

Pour me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse, veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir mis en contact avec Gwennaëlle Soulard, coordinatrice de la banque BCB-G, sans qui cette thèse n'aurait pu être réalisée.

A Madame Virginie André, PH – CHRU de Tours

Pour avoir accepté de diriger la partie clinique de cette thèse, pour l'intérêt que tu y as porté et le temps que tu y as consacré, je tiens sincèrement à te remercier. Merci également pour les 2 semestres effectués à tes côtés, 2 semestres particulièrement enrichissants, l'oncologie ayant toujours suscité chez moi un réel intérêt.

A Monsieur Christophe Olivier, MCU – Faculté de Pharmacie Nantes

Parce que vous êtes à l'origine de ce travail de thèse, veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères. J'ai commencé mon internat avec une idée en tête : « aller faire de la recherche à Nantes ». Merci de m'avoir permis d'atteindre ce but. Cette année au sein du CRCINA aura été extrêmement enrichissante tant sur le plan humain que professionnel. Merci également pour votre encadrement sans faille au cours de mon master 2 puis durant ce travail de thèse.

Parce que cette thèse n'aurait pu être réalisée sans l'aide précieuse de **Gwennaëlle Soulard**, coordinatrice de la banque BCB-G au sein du CHU d'Angers, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude et de mes plus sincères remerciements. Merci pour tout le temps consacré, merci d'avoir répondu présente à toutes mes sollicitations et enfin merci de m'avoir toujours transmis les données en temps et en heure.

Un grand merci également à **l'équipe d'aide méthodologique CoMeth** du CHRU de Tours, et plus particulièrement à Marc Tassi, interne au sein du SIMEES du CHRU de Tours. Merci pour votre

expertise, votre aide et vos conseils. Marc, un énorme merci, pour le temps, l'intérêt que tu as porté à ce projet ainsi que pour tout le travail d'analyse que tu as réalisé.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier toutes les personnes qui de prêt ou de loin, ont transformé cet internat en formidable aventure professionnelle mais aussi, et surtout, en formidable aventure humaine !

Ainsi, merci **à tous les pharmaciens qui ont pu m'encadrer**, me transmettre leur savoir au cours de cet internat : merci aux pharmaciens du CH de Cognac, du CHU de Poitiers et du CHRU de Tours.

Merci également **aux membres de l'équipe 9 du CRCINA**, avec un merci particulier à Lisa et Fanny. En effet, c'est en partie grâce à vous que cette thèse a pu être effectuée puisque c'est vous qui m'avez initiée aux différentes techniques de base de culture cellulaire.

Merci également **aux différents préparateurs et externes en pharmacie** avec qui j'ai pu travailler et échanger.

Un grand merci **à tous les co-internes ou co-master rencontrés au cours de cet internat**. De la coloc en maison de retraite à Cognac, au bureau des internes à Trousseau, en passant par l'open space et l'internat de Poitiers ainsi que le piano de Kaplan, la cuisine et la salle de culture du CRCINA, tout aura été parfait ! Merci à Julie, Rudy, JB, Vivien, Julie, Karen, Mylène, Christel, Marion, Béranger, Lucile, Delphine, Marine, Tilda, Ophélie, Floriane, Nina,... parce que sans vous cet internat n'aurait probablement pas été aussi bien !

Merci **aux copains-copines du sport**, pour tous les moments partagés, sur une piste, une route, un chemin, un vélo, un terrain de hand, un court de tennis, à la mer, à la montagne, au sein d'une piscine, d'un lac, d'une rivière, d'une salle d'escalade, de squash... Parce que le sport, c'est la vie et à plusieurs c'est quand même plus sympa !

Merci **à mes amis de toujours**, pour leur amitié fidèle, sincère et leur indéfectible soutien ! Un grand merci pour tous les merveilleux moments déjà partagés et ceux à venir !

Le plus grand merci ira **à ma famille**, notamment à mes parents et à mon frère : merci pour votre soutien et votre amour. Merci de me pousser à rêver toujours un peu plus et de me ramener sur terre lorsque je rêve un peu trop !

Enfin, merci à tous ceux que j'oublie mais qui auront contribué à transformer toutes ses années d'étude en années bonheur !

Abréviations

ADI	Acceptable daily intake
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
BCB-G	Base de données Clinico-biologiques de Glioblastomes
BCL-2	B-cell lymphoma-2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BPTES	Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CAF ADI	CAF exposés aux pesticides
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5
COX2	Cyclooxygénase 2
CPT1	Carnitine Palmytransférase
CSC	Cellules Souches Cancéreuses
CRCINA	Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor 4
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DJA	Dose journalière acceptable
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ETX	Etomoxir
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
GBM	Glioblastome multiforme
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein

GLS	Glutaminase
HK2	Hexokinase 2
HR	Hazard Ratio
HRP	Horseradish peroxydase
ICT-107	ImmunoCellular Therapeutics-107
IC 95%	Intervalle de confiance à 95%
IDH	Isocitrate dehydrogenase
IGF-1	Insulin Like Growth Factor 1
IL-6	Interleukine-6
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IV	Intraveineuse
JC	Jésus-Christ
LL-37	Leucine-Leucine 37
MC	Milieu conditionné
MEM	Alpha-Minimum Essential Medium
ME-T	Microenvironnement tumoral
MGMT	O6-methylguanine DNA methyltransferase
MPC	Mitochondrial pyruvate carrier
MSC	Mesenchymal stem cell – Cellule souche mésenchymateuse
MSC ADI	MSC exposées aux pesticides
MVE	Corps multivésiculaires
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NR	Non renseigné
OCR	Oxygen Consumption Rate
OCT 4	Octamer binding transcription factor 4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PesCA	Pesticides and Cell Aging
PGE₂	Prostaglandine E ₂
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RCF	Force Centrifuge Relative
RPM	Rotation par minute
SALL 4	Sal-like protein 4
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor 1
SDS	Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard Error of the mean
SIMEES	Service d'Information Médicale, Epidémiologie et Economie de la santé
α-SMA	α -Smooth muscle actin
SNC	Système nerveux central
SOX 2	Sex (determining région Y)-box 2
StemPest	Pesticides and Stem cells
SVF	Sérum de veau foetal
TMZ	Témazolomide
UK5099	(E)-2-cyano-3-(1-phenylindol-3-yl)prop-2-enoic acide
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique du SNC, inspirée de Kamur, 2014.....	6
Figure 2 : représentation schématique du rôle du gène <i>mgmt</i> dans la résistance au traitement.....	11
Figure 3 : rôle des MSC dans le microenvironnement tumoral – inspirée de Whiteside, 2018.....	13
Figure 4 : modification du sécrétome des MCS exposées aux pesticides (Leveque et al., 2019).....	16
Figure 5 : protocole de co-culture et obtention des milieux conditionnés MC MSC, MC CAF, MC MSC ADI, MC CAF ADI.....	20
Figure 6 : démarche expérimentale – exposition d’une primoculture gliale aux MC de MSC, CAF +/-ADI.....	22
Figure 7 : exploration de la respiration mitochondriale.....	25
Figure 8 : protocole de dilution limitante.....	27
Figure 9 : étude par FACS des marqueurs de surface des MSC et CAF après 21 jours d’exposition aux pesticides.....	28
Figure 10 : étude par FACS du marqueur de surface CD10 après 21 jours de culture.....	29
Figure 11 : effets des pesticides sur les MSC et CAF.....	30
Figure 12 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur la prolifération et la viabilité des cellules tumorales gliales COXCa.....	32
Figure 13 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur le caractère souche des cellules tumorales gliales COXCa.....	33
Figure 14 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur la sensibilité au TMZ des cellules tumorales.....	34
Figure 15 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur le métabolisme des cellules tumorales gliales COXCa.....	36

<u>Figure 16 :</u> les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides forment d'avantage de clones	37
<u>Figure 17 :</u> schéma de l'expérimentation.....	38
<u>Figure 18 :</u> effet du MC de CAF pré-exposés aux pesticides (MC CAF ADI) sur le métabolisme des cellules tumorales gliales COXCa.....	39
<u>Figure 19 :</u> teneur en CCL5 du MC de CAF pré-exposés aux pesticides par rapport à celle du MC de CAF non exposés.....	40
<u>Figure 20 :</u> impact des pesticides sur la sensibilité au traitement par témozolomide des cellules tumorales gliales COXCa.....	42
<u>Figure 21 :</u> schéma bilan de l'impact des MSC et des MSC pré-exposées aux pesticides dans le microenvironnement tumoral.....	47
<u>Figure 22 :</u> comparaison des groupes « patients professionnellement exposés aux pesticides » et « patients non exposés aux pesticides ».....	53
<u>Figure 23 :</u> impact de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale, la survie sans rechute et l'âge au diagnostic.....	58

Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> :	classification des astrocytomes selon l’OMS 2007, selon Louis et <i>al.</i> , 2007.....	7
<u>Tableau II</u> :	concentrations des pesticides utilisés dans le mélange.....	18
<u>Tableau III</u> :	taux d’ensemencement cellulaire en fonction du temps d’exposition au témozolomide.....	23
<u>Tableau IV</u> :	anticorps primaires utilisés.....	24

Sommaire

I.	Introduction.....	1
A.	Pesticides : utilisation, exposition et impact sur la santé	1
1.	Utilisation des pesticides	2
2.	Exposition aux pesticides	3
3.	Mesure de l'exposition aux pesticides	4
4.	Pesticides et cancers	5
B.	Glioblastome : incidence, traitement.....	6
1.	Incidence des glioblastomes	8
2.	Traitements	8
3.	Glioblastome et résistance au traitement	10
C.	Projet d'étude et contexte de recherche.....	14
II.	Etude expérimentale : impact d'un mélange de pesticides sur l'agressivité des glioblastomes et la chimiorésistance	15
A.	Matériels et méthodes.....	17
1.	Pesticides	17
2.	Culture cellulaire et traitement	18
3.	Étude de l'expression des protéines par Western-blot.....	23
4.	Analyse du métabolisme par technique Seahorse®	24
5.	Analyse du cycle cellulaire	26
6.	Dosage de la chemokine CCL5 dans le MC de MSC et CAF, exposés ou non aux pesticides, par test ELISA	26
7.	Test de clonogénicité	27
8.	Analyse statistique	27
B.	Résultats	28
1.	Impact des pesticides sur les cellules stromales et induction des CAF	28
2.	Impact de la co-culture CAF (+/- pesticides)-cellules tumorales gliales.....	31
3.	Impact du milieu conditionné de CAF pré-exposés aux pesticides sur les cellules tumorales gliales	38
4.	Impact direct des pesticides sur les cellules tumorales gliales	41
C.	Discussion	42
III.	Etudes cliniques : impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur l'agressivité et la réponse aux traitements.....	48
A.	Matériels et méthodes.....	48
1.	Format de l'étude, base de données et autorisations.....	48
2.	Population	49
3.	Critères de jugement	49

4.	Statistiques	49
B.	Résultats	50
1.	Composition des deux populations étudiées	50
2.	Analyse de l'impact de l'exposition professionnelle aux pesticides, (du sexe, de l'âge et du traitement) sur la survie globale et la survie sans rechute des patients	55
C.	Discussion	59
IV.	Conclusion générale	64

I. Introduction

A. Pesticides : utilisation, exposition et impact sur la santé

Le terme « pesticide », dérivant des mots latin « *pestis* » (fléau) et « *caedere* » (tuer), désigne toute substance ou préparation utilisée pour prévenir, contrôler ou éliminer des organismes jugés indésirables, qu'ils s'agissent de plantes, d'animaux, ou de champignons. Les pesticides peuvent être classés selon leur cible ou encore selon leur composition chimique. Selon leur cible, 3 grands groupes de pesticides se distinguent :

- les herbicides, luttant contre les plantes adventices par perturbation de la photosynthèse, par inhibition de la synthèse des acides aminés, des lipides... ;
- les insecticides, luttant contre les insectes nuisibles par une action neurotoxique, ou encore par inhibition de la respiration cellulaire ou de la mise en place de la cuticule ;
- les fongicides, luttant contre les champignons pathogènes par inhibition de la respiration cellulaire, par perturbation du métabolisme des glucides, de la synthèse protéique, de la division cellulaire...

Facteurs importants du développement de la production agricole dans les années 1950, les pesticides constituent aujourd'hui, l'une des préoccupations environnementales à l'échelle planétaire. Leur utilisation remonte pourtant à l'Antiquité. En effet, VIII siècles avant Jésus-Christ (JC), Homère faisait déjà référence à l'emploi du soufre comme agent de fumigation dans son œuvre « l'Odyssée ». Au I^{er} siècle après JC, Pline l'ancien, naturaliste romain, recommande l'usage de l'arsenic comme insecticide. Toutefois, c'est au cours du XX^{ème} siècle que l'utilisation des pesticides connut un véritable essor avec la naissance de la chimie organique. Ainsi, au cours des années 1900 sont apparus, entre autres, les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates... Les organochlorés, avec notamment le DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), ont été massivement utilisés dans les années 1940, notamment, pour lutter contre les poux, le typhus ou encore le paludisme. Mais, en raison, entre autres, de leur longue rémanence dans l'environnement, la plupart de ces composés ont été interdits dans les années 1970. Ils ont alors été remplacés par les organophosphorés, intéressants de par leur faible persistance dans l'environnement. Mais, ces derniers présentent toutefois une réelle toxicité pour les vertébrés. Les organophosphorés sont des inhibiteurs, notamment, de l'acétylcholinestérase, enzyme dégradant l'acétylcholine en choline inactive et en acétate. De cette inhibition résulte une accumulation en acétylcholine au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, accumulation responsable d'une hyperstimulation des récepteurs nicotiniques et muscariniques provoquant notamment une bronchoconstriction pouvant entraîner la mort par

asphyxie. Ainsi, par exemple, l'un des premiers organophosphorés synthétisé est le tabun, un gaz de combat produit par les allemands lors de la seconde guerre mondiale mais non utilisé au cours de ce conflit.

1. Utilisation des pesticides

Lutter contre les plantes adventices, lutter contre les champignons, les insectes et parasites s'attaquant aux cultures mais aussi désinfecter l'eau potable, protéger les bétails des infections, lutter contre les parasitoses humaines, les poux... : l'utilisation des pesticides est multiple. Selon leurs usages, ces produits relèvent de quatre réglementations européennes :

- les produits phytosanitaires utilisés essentiellement en milieu agricole, mais aussi pour l'entretien des espaces verts, des voiries et des jardins de particuliers. Ils visent à protéger les végétaux contre tous les organismes nuisibles ;
- les biocides regroupant les désinfectants, les produits de protection (du bois notamment), les produits antiparasitaires et les autres produits biocides tels que les produits utilisés pour l'embaumement et la taxidermie ;
- les médicaments vétérinaires regroupant les médicaments utilisés pour lutter contre les parasites des animaux d'élevage et de compagnie ;
- les médicaments à usage humain regroupant les médicaments utilisés en dermatologie, en infectiologie ou en parasitologie pour lutter contre les parasitoses humaines.

La grande majorité des pesticides utilisés sont des produits phytosanitaires et le principal utilisateur est le milieu agricole. Par exemple, en 2008, en France, environ 90% des pesticides vendus, l'ont été pour des usages agricoles (Gatignol et *al.*, 2010).

De manière globale, la consommation de pesticides a doublé tous les 10 ans entre 1945 et 1985 (Bonnefoy, 2012) pour atteindre un pic de consommation en 1999 où 120 000 tonnes de pesticides ont été vendues en France (UIPP 2016). Depuis les années 2000, les quantités vendues ont tendance à décroître et à se stabiliser aux alentours de 60 000 tonnes depuis 2010. Cette diminution puis stagnation s'expliquent notamment par l'utilisation de molécules plus efficaces mais aussi par une prise de conscience de la dangerosité de ces produits, notamment via la diffusion de documentaires tels que « La mort est dans le pré » (Guéret, 2012).

2. Exposition aux pesticides

De par leurs usages multiples depuis des décennies, leur rémanence, les pesticides sont aujourd'hui présents dans tous les milieux de l'environnement : dans le sol, l'air, les eaux de surface et souterraines, mais aussi dans les fluides biologiques humains. Deux types d'expositions humaines se distinguent : l'exposition professionnelle et l'exposition environnementale. L'exposition professionnelle est discontinue mais prolongée et parfois de haute intensité. Bien que les agriculteurs soient les plus concernés par cette exposition, il convient d'y associer, les personnes en charge ou ayant été en charge de l'entretien des voiries, des voies ferrées, des terrains de sports et de loisirs, des espaces communaux ; les jardiniers ; les paysagistes ; les professionnels intervenant dans la désinsectisation des locaux, dans l'hygiène publique, dans les soins vétérinaires, dans le traitement des bois et la manipulation des bois traités, ou encore dans la production de pesticides. Toutefois, ces dernières années, de nombreuses lois tendent à restreindre l'utilisation des pesticides. En effet, la *loi Labbé* en 2014, modifiée par la *loi sur la transition écologique* votée en 2015, interdit, à partir du 1^{er} janvier 2017, l'utilisation de produits phytosanitaires pour l'entretien des espaces verts, forêts, promenades et voiries accessibles ou ouverts aux publics. Malgré ces réglementations récentes, les personnes concernées par l'exposition professionnelle aux pesticides sont ou ont été nombreuses. Les principales étapes d'exposition sont la préparation des mélanges, leur épandage et le nettoyage des cuves. A ces 3 principales étapes d'exposition, il faut ajouter celle survenant lors des taches de ré-entrées, c'est à dire l'exposition survenant au cours des taches réalisées au contact des cultures préalablement traitées (taille, récolte,...).

L'exposition environnementale est, quant à elle, de plus faible intensité mais chronique. Elle est le résultat de la contamination de l'ensemble de l'environnement par l'utilisation professionnelle ou non des pesticides. Bien que des lois récentes (*lois Labbé* et *de la transition écologique*) tentent de limiter cette utilisation non professionnelle en interdisant la vente et la détention de produits phytosanitaires aux particuliers au 1^{er} janvier 2019, l'un des problèmes majeurs aujourd'hui, est le passage des pesticides ou de leurs résidus dans la chaîne alimentaire exposant la population mondiale. En Europe, presque 90% des aliments sont contaminés par au moins un pesticide et près de 3% sont contaminés par un taux supérieur aux réglementations (EFSA, 2017). Bien que cette contamination pour chaque pesticide pris individuellement soit faible et réglementée, les aliments ne sont pas contaminés par un mais par un cocktail de pesticides. Les individus ne sont donc pas exposés à un seul ou à une seule famille de pesticides mais à un mélange de substances. En effet, en France, ces dernières années, le pourcentage d'aliments poly-contaminés a doublé : il est passé de 15% en 1997 à 38% en 2016 (DGCCRF, 2018). Majoritairement pour chaque pesticide, les individus sont exposés à une dose faible, largement inférieure à la dose journalière admissible (DJA ou ADI « acceptable daily

intake ») : quantité estimée d'une substance présente dans les aliments ou dans l'eau potable pouvant être consommée durant toute une vie sans présenter de risque appréciable pour la santé. Mais, les effets de cette poly-exposition chronique par de faibles doses de pesticides sont encore, à ce jour, peu connus. Cette exposition multiple et complexe pourrait mener à des effets additifs ou synergiques (Orton *et al.*, 2014) c'est-à-dire qu'un ou plusieurs pesticides pourraient augmenter fortement les effets d'un autre. A cette contamination alimentaire s'ajoute la contamination de l'air intérieur et extérieur, ou encore des eaux distribuées.

3. Mesure de l'exposition aux pesticides

La connaissance des expositions est un élément clef en épidémiologie environnementale et professionnelle. En effet, les études cas-témoins visent à comparer l'exposition des sujets malades à celles des sujets non malades ; les études de cohorte visent à comparer la fréquence de la maladie des sujets exposés à celle des sujets non exposés. Dans ces deux cas, la validité des résultats dépend donc de la capacité à définir correctement l'exposition des sujets. L'objectif d'une étude d'exposition est d'identifier, avec le plus de précision possible, les produits en cause et de quantifier, dans la mesure du possible cette exposition par une estimation de l'intensité, de la durée et de la fréquence d'exposition.

Il existe deux types d'estimation de l'exposition aux pesticides : une méthode directe par analyse d'échantillons (prélèvements biologiques, mesures dans l'environnement...) et une méthode d'analyse indirecte faisant recours à des questionnaires, des matrices emploi-expositions...

La plupart des analyses d'exposition par méthode directe se font à partir du sang ou des urines. Une connaissance de la pharmacocinétique des pesticides et de leurs métabolites est donc nécessaire. Cette méthode nécessite également de disposer de techniques de dosages appropriées. De plus, la majorité des pesticides utilisés aujourd'hui ont une demi-vie relativement courte (quelques jours) obligeant la réalisation des dosages peu de temps après l'exposition et restreignant donc l'étude aux expositions récentes ou chroniques. Pour pallier à cette limite, ces dernières années, les cheveux, matrice couramment utilisée en toxicologie et médecine légale de par leur capacité à archiver de longues périodes d'exposition, présentent un intérêt croissant (Béranger *et al.*, 2018). Cette capacité à archiver de longues périodes d'exposition dépend toutefois de la longueur des cheveux : en supposant une pousse de cheveux de 1 cm par mois, un cheveu de 3 cm permettra alors d'estimer l'exposition des 3 derniers mois. Bien que présentant un intérêt supérieur au sang et aux urines, les cheveux ne permettent toutefois pas d'estimer l'exposition totale. Or, pour des études s'intéressant à des pathologies à temps de latence long comme les cancers, il est capital de prendre en compte l'ensemble des expositions survenues au cours de la vie. Pour cela, l'estimation de l'exposition par des méthodes

indirectes est intéressante. En effet, les méthodes indirectes via des questionnaires, des systèmes d'informations géographiques, des matrices emploi-exposition tentent de reconstituer l'historique de l'exposition aux pesticides.

4. Pesticides et cancers

Depuis longtemps, la contribution de l'environnement dans la survenue de cancer est suspectée : dès la fin du XVIII^{ème} siècle une association est établie entre la survenue de cancer du scrotum et l'exposition professionnelle à la suie.

Les pesticides, en luttant contre les ravageurs nuisibles, ont limité les pertes agricoles, permettant ainsi d'augmenter considérablement les rendements agricoles, ces derniers ayant plus que doublé au cours de ces dernières décennies (Expertise collective Inserm, 2013). En outre, bien que les pesticides soient conçus pour tuer des organismes nuisibles, il est important de préciser qu'ils ne sont pas pour autant dénués de toxicité vis-à-vis des autres espèces. Ainsi, en 1962, la biologiste américaine, Rachel Carson, dénonça pour la première fois la toxicité écologique et sanitaire des pesticides dans son ouvrage « Le Printemps Silencieux » (Carson, 1962). Ce livre, à l'impact retentissant, contribua notamment à la naissance des mouvements écologistes et à l'interdiction du DDT aux Etats-Unis dans les années 1970. Suivirent de nombreuses études épidémiologiques qui mirent en évidence une augmentation de l'incidence de certains cancers (lymphomes, leucémies, myélomes, cancers de la prostate, du testicule, mélanomes et tumeurs cérébrales) chez les agriculteurs, population d'individus normalement reconnue pour son mode de vie sain. Les agriculteurs étant les individus les plus exposés aux pesticides, dès lors, un lien a été établi entre l'utilisation de pesticides et la survenue de cancers. Ainsi, aujourd'hui, de nombreux pesticides sont classés comme agents cancérigènes probables (groupe 2A) ou possibles (groupe 2B) par le Centre International de Recherche sur le Cancer. Les mécanismes d'action des pesticides en cancérogenèse peuvent être multiples : altération du matériel génétique, déséquilibre des processus de survie et de mort cellulaire, liaison à des récepteurs nucléaires ou hormonaux, bioactivation métabolique ou encore génération de stress oxydant (Expertise collective Inserm, 2013). Récemment, Sylvain Lamure, hématologue au CHU de Montpellier et Pascale Fabro Peray, médecin de santé publique au CHU de Nîmes, ont montré que l'exposition professionnelle agricole aux pesticides pourrait être un facteur de mauvais pronostic en terme de réponse au traitement, de survie sans maladie active et de survie globale dans le lymphome B diffus à grande cellule. En effet, le taux de non réponse complète au traitement est de 22.4 % pour les patients exposés aux pesticides alors qu'il est de 11.3 % pour les patients non exposés ($p=0.007$), 70 % des patients exposés sont vivants sans rechute à 2 ans, contre 82 % pour les non exposés ($p=0.0088$) et 81 % des patients agriculteurs exposés sont vivants à 2 ans contre 92 % pour le reste

de la population ($p=0.005$) (Lamure et *al.*, 2017). Enfin, également dans la population agricole, les études épidémiologiques ont mis en cause l'utilisation au long cours de pesticides dans l'augmentation de la survenue de tumeurs cérébrales : lors d'une étude cas-témoins réalisée dans le sud-ouest de la France entre 1999 et 2001, Provost et *al.*, constatèrent une augmentation significative du développement de tumeurs cérébrales ($OR=2.16$, IC 95 % = 1.10- 4.23) et de gliomes ($OR=3.21$, IC 95 % = 1.13-9.11) chez les patients exposés aux pesticides (Provost et *al.*, 2007). Une étude réalisée dans le Midwest, aux Etats-Unis, entre 1995 et 1998, a quant-à elle montré que l'absence de lavage de mains ($OR = 3.08$, 95 % IC 95 % = 1.78-5.34) et de changement de vêtements ($OR = 2.84$, IC 95 % = 1.04-7.78) après l'application de pesticides était associée à une augmentation de la survenue de gliomes chez les résidents fermiers (Ruder et *al.*, 2009).

B. Glioblastome : incidence, traitement

Les gliomes représentent 70 % des tumeurs cérébrales primitives. Ce sont des tumeurs du système nerveux central (SNC) dérivant essentiellement de cellules gliales. Le système nerveux central est constitué de l'encéphale et de la moelle épinière ; elle-même composée des neurones et de cellules gliales. Ces cellules gliales, également appelées glie, assurent le soutien et la protection des cellules nerveuses (Allen et *al.*, 2009). On distingue la magroglie, composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes et de cellules épendymaires et la microglie constituée de macrophages (Figure 1).

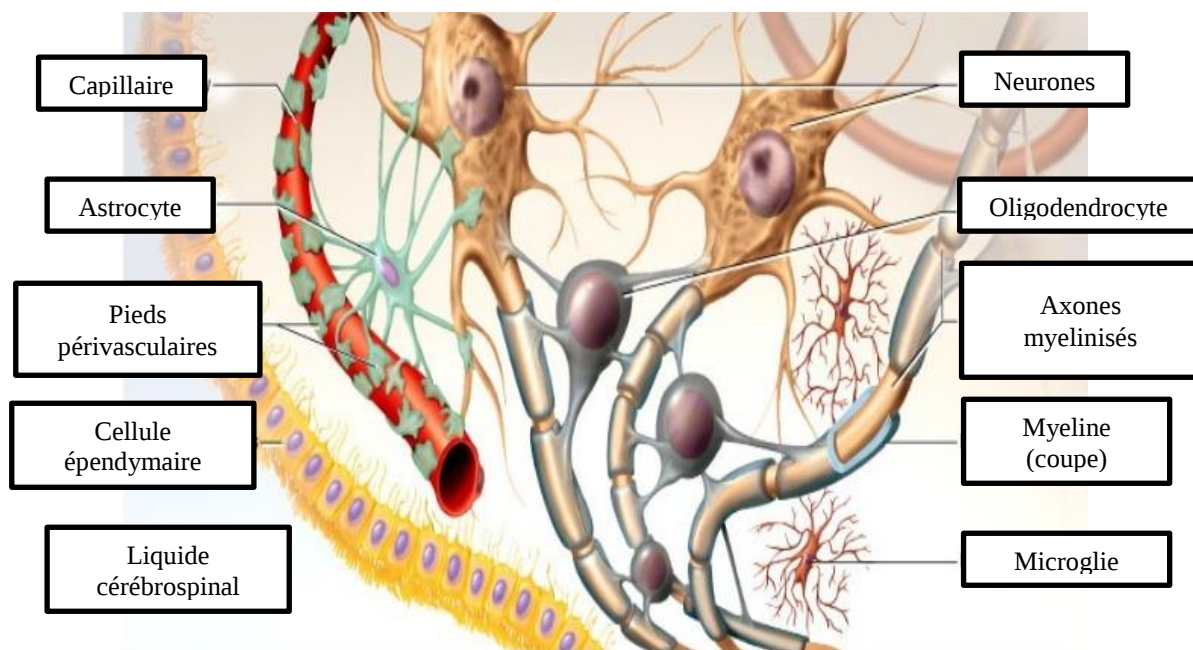


Figure 1 : représentation schématique du SNC, inspirée de Kamur, 2014

En 2007, la classification des gliomes, selon l’OMS, repose sur le phénotype des cellules tumorales :

- les astrocytomes : partageant les caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques des astrocytes notamment caractérisés par un marquage GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) positif ;
- les oligodendrogliomes : partageant les caractéristiques des oligodendrocytes ;
- les oligoastrocytomes ou tumeurs mixtes : partageant les caractéristiques des astrocytes et des oligodendrocytes.

Cette classification repose également sur le grade de malignité : du grade I, le moins agressif, au grade IV, le plus malin. Le grade est défini à partir de cinq critères : la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l’activité mitotique, la prolifération endothéliocapillaire et la nécrose (Louis et al., 2007). Le grade I correspond à des tumeurs bénignes, bien délimitées, à croissance lente ; le grade II, également à des tumeurs de croissance lente mais ayant une tendance à l’infiltration du tissu sain. Le grade III correspond quant-à lui à des tumeurs à croissance rapide avec un caractère infiltrant important. Enfin, le grade IV correspond aux tumeurs caractérisées par une croissance rapide, une nécrose et une infiltration importante du tissu sain. Les astrocytomes de grade IV, les plus malins, sont appelés glioblastomes (Tableau I).

Astrocytomes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération vasculaire
Grade II : astrocytome diffus	Bien différencié	Modérée	Occasionnelles	Absente	Absente	Absente
Grade III : astrocytome anaplasique	Plages d’anaplasie focales ou diffuses	Augmentée	Présentes	Présente	Absente	Absente
Grade IV : glioblastome	Faible	Elevée	Marquées	Marquée	Présente	Présente

Tableau I : classification des astrocytomes selon l’OMS 2007, selon Louis et al., 2007

Cette classification présente toutefois certaines limites. En effet, elle manque de reproductibilité intra- et inter-individuelle notamment du fait de l’hétérogénéité tumorale, de la non représentativité du

prélèvement, de la difficulté à distinguer les cellules tumorales du parenchyme sain, ou encore de l'absence de biomarqueurs spécifiques permettant de reconnaître le type précis des cellules tumorales. En 2016, la nouvelle classification de l'OMS tient compte, en plus des critères histologiques, de critères génotypiques (mutations d'IDH1/2 (Isocitrate Déshydrogénase 1/2), codélétion 1p/19q), rendant ainsi cette classification moins subjective et plus précise.

1. Incidence des glioblastomes

Le glioblastome ou *Glioblastome Multiforme* (GBM) est la tumeur primaire cérébrale la plus fréquente : elle représente 40% des tumeurs cérébrales. L'âge moyen, au moment du diagnostic, est de 61,9 ans (Zouaoui et *al.*, 2012). Cette tumeur prédomine chez les hommes dans un rapport de 1,5 à 1,8/1 selon les études (Baldi et *al.*, 2010).

Il s'agit d'une tumeur plutôt rare, son incidence étant de 3 cas pour 100 000 habitants en France. Mais son pronostic est sombre : la moyenne de survie est de 15 mois une fois le diagnostic établi (Ostrom et *al.*, 2015). Ce pronostic critique atteste de l'inefficacité du traitement actuel.

2. Traitements

Le traitement actuel repose, lorsqu'elle est possible, sur une exérèse chirurgicale. La qualité de l'exérèse est un facteur pronostic majeur. Elle doit être la plus large possible de la tumeur sans entraîner de déficit cognitif majeur. Plusieurs techniques permettent d'aider le chirurgien : la neuronavigation, l'échographie peropératoire, l'écho neuronavigation, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peropératoire ou encore le guidage par fluorescence via l'acide 5-amino-lévulinique (Jacquesson et *al.*, 2012). Afin d'apprécier la qualité de l'exérèse, une IRM doit être réalisé dans les 72 h suivant l'intervention. L'exérèse est complète lorsqu'aucune prise de contraste résiduelle n'est observée à l'IRM postopératoire (Carpentier, 2008). Elle est qualifiée de subtotale ou partielle lorsque respectivement plus ou moins de 90 % de la masse tumorale ont été réséquées. Toutefois, il est important de préciser qu'en raison du caractère infiltrant des glioblastomes, cette exérèse ne peut être totale. Lorsqu'une résection chirurgicale est impossible, notamment en raison de l'état général du patient ou encore de la localisation tumorale, une simple biopsie sera réalisée afin d'établir le diagnostic anatomopathologique.

En post-opératoire, le traitement standard est une association de radio- et chimiothérapie (Stupp et *al.*, 2005). La chimiothérapie usuellement utilisée est le témozolomide (TMZ), un agent alkylant

empêchant la réplication de l'ADN. En fonction de l'âge et de l'état du patient, le protocole thérapeutique standard est le protocole Stupp associant de la radiothérapie (2 Gy/jours 5 j/7j pendant 6 semaines pour un total de 60 Gy) au témozolomide (75 mg/m² tous les jours pendant 6 semaines puis 150 à 200 mg/m² pendant 5 jours toutes les 4 semaines à renouveler 6 fois). Bien que ce protocole ait permis d'augmenter la survie moyenne des patients de 12,1 mois (traitement par radiothérapie seule) à 14,6 mois (traitement par le protocole Stupp), il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement permettant la guérison définitive des patients atteints de glioblastome. En effet, à plus ou moins long terme, le patient va présenter une récurrence tumorale. Une progression tumorale correspond à une augmentation supérieure ou égale à 25 % du produit des diamètres de la prise de contraste, à l'apparition de nouvelles lésions ou à l'aggravation de l'état neurologique du patient.

Concernant le traitement de ces récurrences, il n'existe aucun consensus (Hundsberger et *al.*, 2016). Suivant l'âge du patient, le délai entre l'exérèse initiale et la survenue de la récurrence, le volume et l'envahissement tumoral, la dose d'irradiation déjà délivrée, une reprise neurochirurgicale et/ou une ré-irradiation peuvent être proposées (Parck et *al.*, 2013). La carmustine, la lomustine et la fotemustine, appartenant à la famille des nitroso-urées, sont les agents alkylants disposant d'une AMM (autorisation de mise sur le marché) de 2^{ème} ligne. La carmustine peut être utilisée de manière locale : des implants biodégradables imprégnés de carmustine (Gliadel®) peuvent être déposés dans la cavité d'exérèse. Ces implants possèdent une AMM pour le traitement de 1^{ère} (seul ou en association avec le protocole Stupp) ou de 2^{ème} ligne lorsqu'une résection chirurgicale est réalisable (Brem et *al.*, 1995). Il est toutefois important de préciser que l'implantation de Gliadel® est un critère d'exclusion de la majorité des essais cliniques testant de nouvelles molécules. La carmustine peut également être utilisée par voie intraveineuse (IV) : cure de 150 à 200 mg/m² toutes les 6 semaines sans dépasser la dose cumulée de 1200 mg/m² (ANOCEF, 2018). La lomustine (Belustine®), quant à elle, est utilisée par voie orale (100 à 130 mg/m² toutes les 6 semaines) (Wick et *al.*, 2010) et la fotemustine par voie IV (100 mg/m² à J1, J7 et J14, repos thérapeutique de 4 à 5 semaines puis injection à la dose de 100 mg/m² toutes les 3 semaines). Le bévécizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), facteur clef de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, ne possède pas d'AMM pour le traitement des tumeurs cérébrales. Toutefois, c'est une molécule particulièrement utilisée dans le traitement des récurrences. Elle est généralement utilisée en association, par exemple à la lomustine ou à l'irinotécan, un inhibiteur de la topo-isomérase I, enzyme contrôlant la structure de l'ADN (irinotécan 125 mg/m² tous les 15 jours et bévécizumab 10 mg/kg tous les 15 jours). Grâce à l'association bévécizumab-lomustine, le taux de survie globale à 9 mois est de 63 % alors qu'il est de 38 % pour le groupe bévécizumab seul et de 43 % pour le groupe lomustine seule (Taal et *al.*, 2014). De même, cette association permet d'augmenter la survie sans progression de 3.22 mois (bévacizumab seul) à 4.96 mois (p=0.08) (Weathers et *al.*, 2016). L'association bévécizumab-

irinotécan permet, quant-à elle, d'augmenter la survie sans progression à 6 mois de 38.8 % (bévacizumab seul) à 48.3 % ($p=0.046$) (Zhang et *al.*, 2012). Toutefois, le bévacizumab n'a jamais obtenu d'AMM pour le traitement des récidives, en raison, notamment, du manque de preuve de l'augmentation de la survie et de l'absence de comparaison avec une autre molécule.

Enfin, du fait de l'inexistence d'un traitement efficace à ce jour, de nombreux travaux de recherche et de nombreuses études cliniques sont en cours. Par exemple, une étude de phase II de l'Hôpital Avicenne-Bobigny vise à comparer le nivolumab au témozolomide, en association avec la radiothérapie chez les sujets nouvellement diagnostiqués de glioblastome MGMT-méthylé (MethylGuanine MethylTransferase) ; une étude de phase III de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière vise à étudier la sécurité et l'efficacité de l'ICT-107 (ImmunoCellular Therapeutics-107) chez les patients nouvellement diagnostiqués de glioblastome après résection et chimioradiothérapie. L'ICT-107 est une immunothérapie à base de cellules dendritiques autologues ciblant 6 antigènes différents associés au glioblastome, notamment des biomarqueurs de cellules souches cancéreuses. Ainsi, l'ICT-107 surmonte les mécanismes d'échappement tumoral.

3. Glioblastome et résistance au traitement

Le glioblastome est connu pour être une tumeur de très mauvais pronostic puisque moins de 10% des patients sont encore en vie 5 ans après le diagnostic. Ce pronostic atteste de l'existence de plusieurs mécanismes de résistance tels que l'existence de gène codant pour des enzymes inactivant la chimiothérapie, l'existence d'un microenvironnement favorable au développement tumoral, de cellules échappant aux traitements telles que les cellules souches cancéreuses...

a- Méthylation du promoteur de la MethylGuanine MethylTransferase (MGMT)

Le gène *mgmt* situé sur le chromosome 10 code pour une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN : la O-méthyl-guanine-ADN-méthyltransférase (MGMT). En effet, cette enzyme inhibe l'activité des agents alkylants tel que le TMZ en transférant sur elle-même le groupement alkyle de l'O₆-methylguanine, groupement qui inhibait la réplication de l'ADN.

La méthylation du promoteur de la MGMT entraîne une inhibition de la transcription de ce gène et donc un défaut de production de l'enzyme MGMT (Figure 2). Ainsi, une méthylation du promoteur de la MGMT est un facteur de bon pronostic, d'une meilleure sensibilité au traitement par TMZ (Bell et *al.*, 2018).

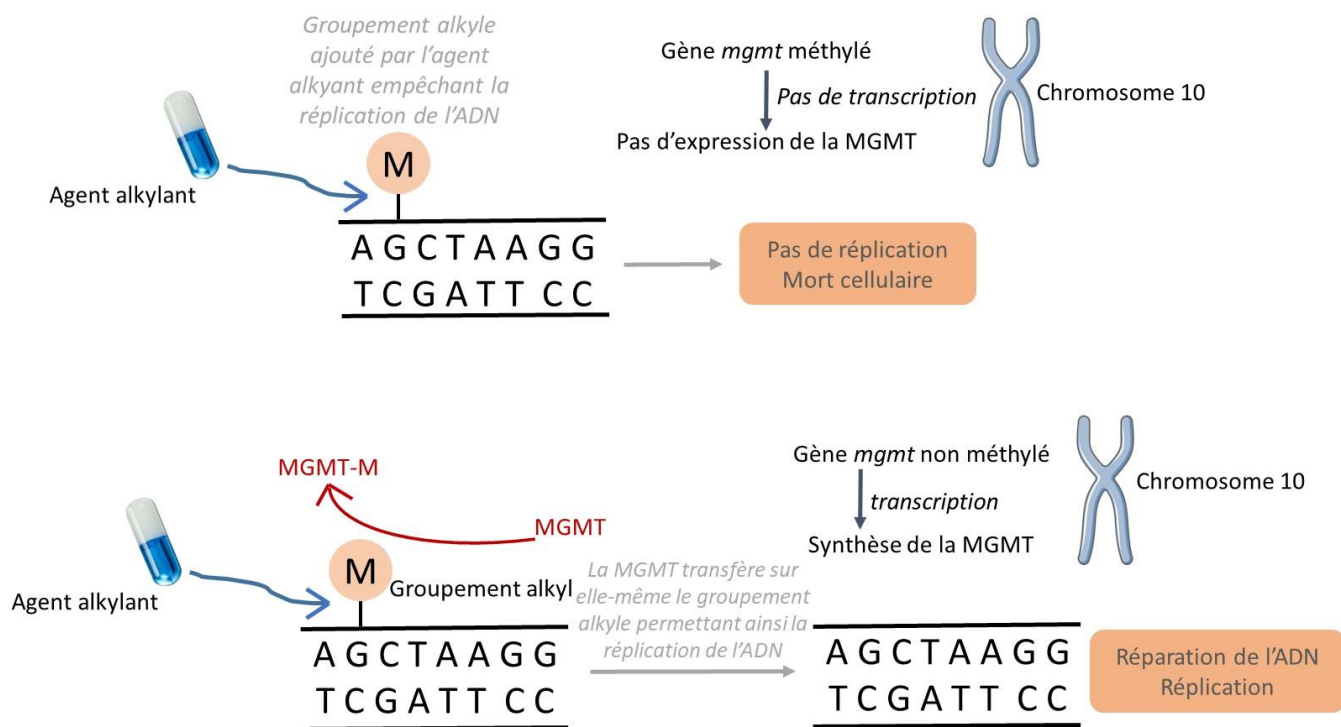


Figure 2 : représentation schématique du rôle du gène *mgmt* dans la résistance au traitement

b- Microenvironnement tumoral

Aux alentours des cellules tumorales, de nombreuses cellules avoisinantes interagissent entre elles afin de former un microenvironnement tumoral (ME-T) favorable à la prolifération et à l'agressivité des cellules tumorales. Parmi ces cellules du ME-T, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) jouent un rôle clef (Whiteside, 2018). Les MSC sont des cellules multipotentes adultes capable d'auto-renouvellement et de différenciation en ostéoblastes, en chondrocytes ou encore en adipocytes (Pittenger et *al.*, 1999). Elles peuvent provenir de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du placenta ou du cordon ombilical. Elles expriment les marqueurs de surface CD73, CD90 et CD105 et n'expriment pas les marqueurs CD14, CD20, CD34 et CD45 (Dominici et *al.*, 2006). Elles ont un tropisme pour les cellules tumorales et les sites inflammatoires. Elles sont ainsi retrouvées dans le microenvironnement de nombreux cancers dont celui du glioblastome (Birnbaum et *al.*, 2007). Les MSC jouent alors un rôle crucial dans la progression et l'agressivité tumorale (Figure 3). En effet, il existe un dialogue bidirectionnel entre les cellules tumorales et les MSC. Par exemple, les cellules tumorales vont sécréter de l'IGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1) (Makinoshima et *al.*, 2009) ou du LL-37 (Leucine-Leucine 37) entraînant le relargage par les MSC de CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5), connue pour favoriser les métastases du cancer du sein (Karnoub et *al.*, 2007). Ce dialogue bidirectionnel peut donc s'effectuer par l'intermédiaire de facteurs solubles mais aussi de vésicules

extracellulaires telles que les exosomes (Whiteside, 2018). Les exosomes sont les plus petites vésicules extracellulaires connues à l'heure actuelle. Ils sont formés au sein des endosomes par bourgeonnement interne de la membrane endosomique entraînant la formation de corps multivésiculaires (MVE) contenant de nombreux exosomes. Ces MVE vont pouvoir fusionner avec la membrane plasmique conduisant au relargage des exosomes dans le milieu extracellulaire. Ces exosomes présentent de nombreux intérêts : étant synthétisés à l'intérieur de la cellule, ils ont le profil génétique et moléculaire de leur cellule mère. Ils peuvent transporter des protéines, des acides nucléiques, des enzymes, des facteurs solubles, ont une longue demi-vie et passent la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Abels et *al.*, 2016). Ils sont ainsi responsables d'une communication autocrine, juxtacrine ou même paracrine. Les exosomes, mais aussi les facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales, vont agir sur les MSC qu'ils vont transformer en MSC pro-tumorales appelées CAF (Cancer-Associated Fibroblasts) (Borriello et *al.*, 2017). Ces CAF ont acquis des fonctions pro-tumorales. A leur tour, ils vont sécréter des exosomes agissant sur les cellules tumorales mais aussi sur les autres cellules du ME-T telles que les cellules immunitaires, les cellules endothéliales conduisant à une progression tumorale, une augmentation de l'agressivité tumorale ou à une résistance au traitement (Yang et *al.*, 2015). En effet, il a été montré que les CAF jouent un rôle clef dans la résistance au traitement. Ils sécrètent fortement la chimiokine CXCL12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12) également appelée SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1). CXCL12 est la seule chimiokine pouvant se fixer au récepteur tumoral CXCR4 (Teicher et *al.*, 2010). Cette fixation entraîne alors une augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques BCL-2 (B-cell lymphoma 2) et BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large). Ainsi, par exemple, l'utilisation d'un antagoniste de CXCR4 permet de rétablir la sensibilité à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques (Singh et *al.*, 2010). De plus, en réponse à des facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales, les CAF sécrètent à leur tour la chimiokine CCL2 (Chemokine Ligand 2) qui induit l'auto-renouveau des cellules souches cancéreuses par activation de la voie Notch (Tsuyada et *al.*, 2012).

c- Cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont d'autres acteurs clefs de la structure tumorale. En effet, ces cellules sont connues comme résistantes au traitement (notamment de par leur possibilité de passage en quiescence et la surexpression de protéines inhibitrices de l'apoptose) et comme étant probablement à l'origine des récidives tumorales. Elles ont été initialement mises en évidence par Singh et *al.* Ils ont montré qu'une population de cellules CD133⁺ possédant des propriétés de cellules souches *in vitro*, était capable d'initier des tumeurs *in vivo*. Ces tumeurs initiées étaient identiques à

la tumeur initiale (Singh et *al.*, 2004). Deux modèles tentent d'expliquer l'hétérogénéité tumorale : le modèle stochastique et plus récemment le modèle hiérarchique. Selon ce dernier, seules les CSC sont responsables de l'initiation, de la progression, de la récurrence tumorales (Dick, 2008) ainsi que de la résistance au traitement (Catalano et *al.*, 2011). L'identification de ces cellules est donc capitale mais complexe. Le premier marqueur utilisé pour l'identification des CSC gliales est le marqueur de surface CD133 (Singh et *al.*, 2004), marqueur de surface des cellules souches nerveuses saines. Toutefois, l'identification des CSC ne peut reposer uniquement sur l'expression de ce marqueur puisque des cellules gliales CD133⁻ sont capables d'initier un glioblastome chez des rats immunodéprimés (Wang et *al.*, 2007). D'autres marqueurs sont donc nécessaires. SOX2, OCT4, NANOG et SALL4, des facteurs de transcription impliqués dans la maintenance des cellules souches, sont d'autres marqueurs caractéristiques des CSC (Yi et *al.*, 2016).

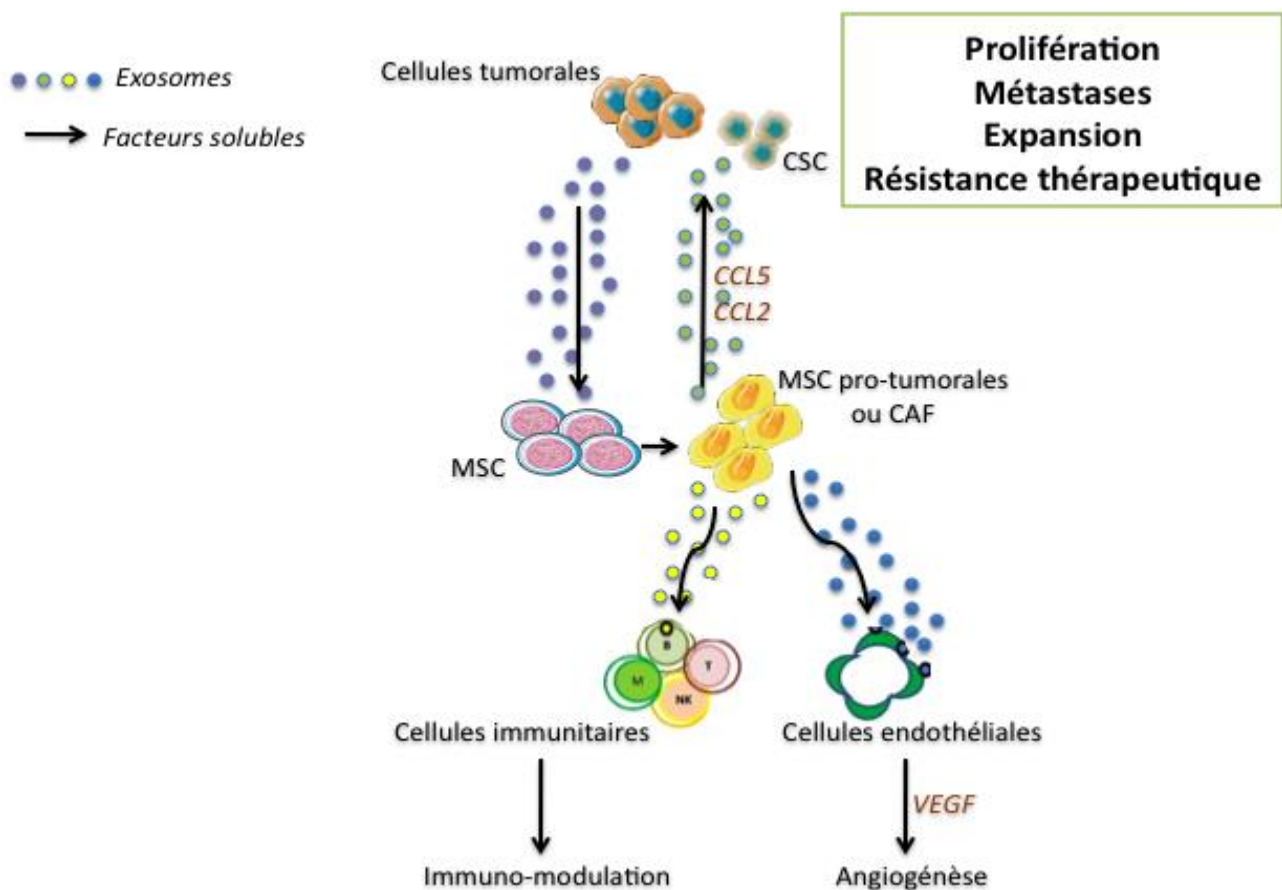


Figure 3 : rôle des MSC dans le microenvironnement tumoral – inspirée de Whiteside, 2018

Les MSC et CAF jouent donc un rôle clef au sein du ME-T et notamment dans l'échappement thérapeutique du glioblastome (Figure 3). Tout élément capable de modifier l'activité, le métabolisme des MSC ou des CAF, paraît susceptible de moduler l'impact de ces acteurs du ME-T sur le tissu tumoral et donc la réponse au traitement.

C. **Projet d'étude et contexte de recherche**

Cette thèse est le résultat de deux études : une étude fondamentale réalisée au sein de l'équipe 9, « Apoptose et progression tumorale », du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA) et une étude clinique rétrospective, réalisée grâce à la banque de données BCB-G (Base de données Clinico-biologiques de Glioblastomes), base clinico-biologique nationale regroupant 29 centres et ayant pour coordinateur le Pr Philippe Menei.

La première partie de ce travail est une étude fondamentale étudiant l'impact d'un mélange de 7 pesticides (pesticides figurant, au début de ce projet, parmi les plus présents dans l'alimentation des européens (4 de ces 7 pesticides étant aujourd'hui retirés du marché)) sur les MSC du microenvironnement tumoral. Plus précisément, il s'agit d'étudier l'impact éventuel de la modification de la niche par ces pesticides (utilisés aux doses nutritionnelles ADI (Acceptable daily Intake), doses considérées comme sans effet chez l'homme) sur l'agressivité tumorale et la résistance au traitement. De façon plus ciblée, ce travail étudie l'impact des pesticides sur l'interaction CAF-cellules gliales cancéreuses.

La deuxième partie de cette thèse est une étude clinique étudiant l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur l'agressivité et la réponse au traitement des glioblastomes. Plus exactement, il s'agit de comparer la survie globale, la survie sans progression et l'âge au diagnostic des patients professionnellement exposés aux pesticides à ceux n'ayant pas déclaré y avoir été exposés.

II. Etude expérimentale : impact d'un mélange de pesticides sur l'agressivité des glioblastomes et la chimiorésistance

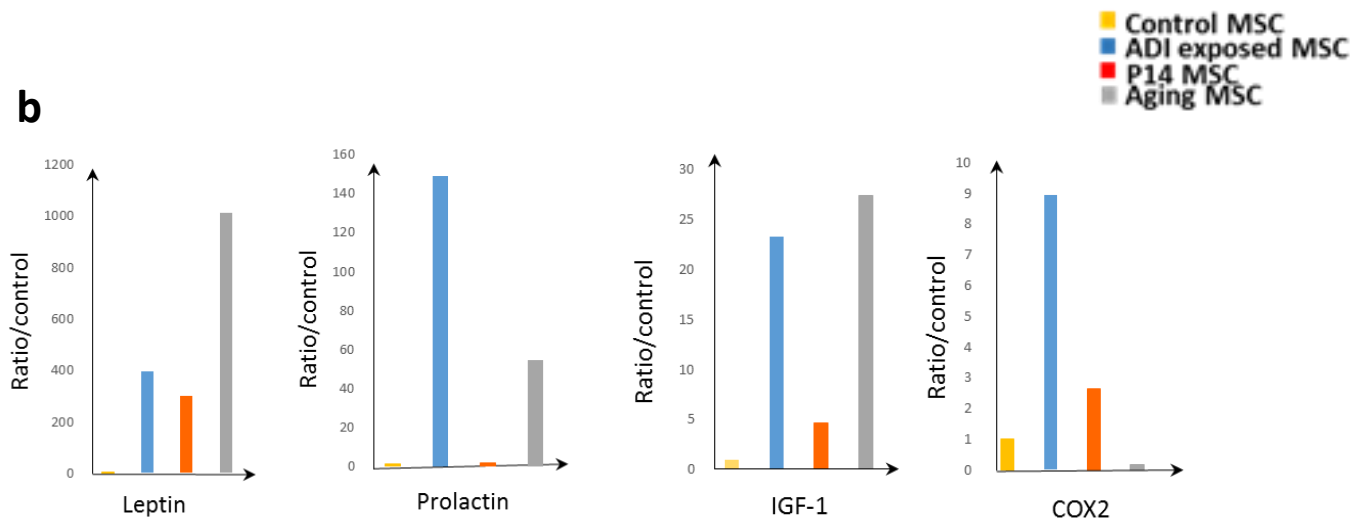
L'équipe 9 du CRCINA possède une expertise dans l'étude du ME-T du glioblastome. Oliver *et al* ont notamment montré que les MSC favorisaient la croissance *in vitro* du gliome par transfert de mitochondries. Cette équipe possède également une expertise dans l'étude de la résistance au traitement chimiothérapeutique au témozolomide (Gratas *et al.*, 2014). Depuis quelques années, elle s'intéresse à l'impact d'un mélange de 7 pesticides, figurant ou ayant figuré, parmi les plus présents dans l'alimentation des européens (extrapolation *in vitro* des doses nutritionnelles ADI) sur les MSC du ME-T. Ainsi les projets StemPest (Pesticides and Stem cells) et PesCA (Pesticides and Cell Aging) ont montré que les pesticides, à ces doses, après 21 jours, induisent une sénescence spécifique des MSC, des modifications métaboliques et une réorientation de la différenciation vers la production d'adipocytes (Hochane *et al.*, 2017). La comparaison de ces cellules exposées avec celles d'un sujet âgé, ou celles issues de multiples passages a montré que ces expositions aux pesticides à des doses non cytotoxiques, induisent une altération de marqueurs métaboliques et une modification des propriétés immunomodulatrices comparables à celles observées au cours du vieillissement (Leveque *et al.*, 2019). Enfin, la modification du sécrétome des MSC, constatée par analyse RNAseq et confirmée par qPCR (Figure 4), laisse penser que l'interaction MSC-cellules tumorales serait modifiée. En effet, l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 (Interleukine-6) est connue pour générer un microenvironnement inflammatoire favorisant la survie, la croissance des cellules souches gliales et contribuant à la malignité (Wang *et al.*, 2009). La surexpression de la prolactine et de la leptine sont connues pour favoriser l'invasion des gliomes (Alkharusi *et al.*, 2016) (Han *et al.*, 2014), celle d'IGF-1 pour réguler la radioprotection adaptative dans les cellules souches de gliome (Osuka *et al.*, 2013). L'amplification de la voie COX-2/PGE₂ (Cyclooxygénase 2/Prostaglandine E₂) est, quant à elle, connue pour favoriser la capacité d'autorenouvellement des CSC dans les gliomes et la résistance au rayonnement (Cook *et al.*, 2016). Enfin, le relargage constatée de CCL2 (Chemikone Ligand 2) est connue pour induire l'auto-renouvellement des CSC (Tsuyada *et al.*, 2012).

a

Gènes	Facteur d'amplification
PRL	109,9
LEP	34,53
SPON1	33,35
IGF1	22,62
MMP10	22
NTN1	16
CCL5	13
PCK1	13
NOG	7,56
PTGS2/COX2	7,56
ICAM1	6,23
IL11	5,81
CXCL12/SDF-1	5,06

Facteurs d'amplification des gènes des MSC exposées 21 jours aux pesticides à la dose ADI par rapport à ceux des MSC contrôles, obtenus par RNAseq

b



c

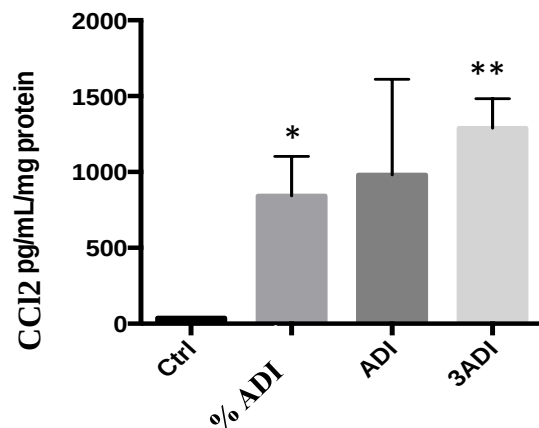


Figure 4 : modification du sécrétome des MCS exposées aux pesticides (Leveque et *al.*, 2019)

a- Up regulation de gènes, par analyse RNAseq, dans les MSC après 21 jours d'exposition aux pesticides à la dose ADI
b- Confirmation du RNAseq par qPCR **c-** teneur en CCL2 (quantifiée par Elisa) du sécrétome de MSC pré-exposés aux pesticides (aux doses %ADI, ADI et 3ADI) par rapport à celle du sécrétome MSC non exposés (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$)

La première partie de ce travail de thèse vise à étudier l'impact de ce mélange de 7 pesticides sur les MSC ou CAF du ME-T, plus précisément l'impact sur la relation MSC/CAF-cellules tumorales. Pour cela, l'impact par contact direct (co-culture) et par contact indirect (via leur sécrétome) des CAF pré-exposés aux pesticides sur la survie, l'agressivité, le métabolisme et la réponse au traitement de cultures primaires de cellules gliales tumorales humaines a été évalué.

A. Matériels et méthodes

Tous les milieux utilisés pour la culture cellulaire proviennent de Life Technologies (UK), les facteurs de croissance, de PeproTech (USA) et le Témzolomide, d'Interchim (France). Tous les produits chimiques, dont les pesticides, proviennent, sauf précision, de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

1. Pesticides

A partir des données de l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments), au début du premier projet sur ce thème, 7 pesticides figurant parmi les plus forts contaminants de l'alimentation des européens (EFSA, 2010) ont été identifiés : le chlorpyrifos-éthyle, le diméthoate, le diazinon, l'iprodion, l'imazalil, le maneb et le mancozeb.

Un mélange de ces 7 composés a été réalisé (Tableau II). Chacun a été utilisé à une dose correspondant à l'extrapolation *in vitro* de sa dose journalière admissible (DJA ou ADI).

L'ADI, exprimée en mg/kg/jour est fixée par la commission européenne (European Commission, 2016). Elle correspond à la quantité estimée d'une substance, présente dans les aliments ou dans l'eau potable, qui peut être consommée durant une vie sans présenter de risque appréciable pour la santé. Supposant une absorption totale chez un individu de 60 kg avec un volume sanguin de 5 L, la concentration plasmatique en $\mu\text{mol/L}$ a ainsi été extrapolée pour chaque pesticide. Les pesticides ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), la teneur finale en DMSO dans le milieu était inférieure à 0.1%, concentration sans effet sur les cultures. Les MSC ont été exposées au mélange de pesticides pendant 21 jours et le milieu a été changé tous les 2-3 jours. Les MSC ne recevant pas de pesticides ont été cultivées en milieu de culture additionné d'une quantité équivalente de DMSO.

Afin d'étudier l'impact d'une exposition directe des cellules tumorales aux pesticides, deux autres doses ont été utilisées : la dose %ADI et la dose 3ADI. La dose %ADI correspond à la teneur en pesticides que l'on retrouve dans l'alimentation (EFSA, 2013). La dose 3ADI correspond, comme son nom l'indique, à 3 fois la dose ADI.

Pesticides	ADI (mg/kg)	ADI en mg/L pour un individu de 60 kg et un volume sanguin de 5 L	Masse moléculaire (g/mol)	ADI (μmol/L)	Exposition population (% ADI)	%ADI (μmol/L)
Chlorpyrifos-éthyle	0,01	0,12	350,59	0,3	3.30	0.01
Diméthoate	0,001	0,012	229,26	0,1	24.67	0.01
Diazinon	0,0002	0,0024	304,35	0,01	36.67	0.003
Iprodione	0,06	0,72	330,17	2,2	0.47	0.01
Imazalil	0,025	0,3	297,18	1,0	6.87	0.07
Maneb	0,05	0,6	265,3	2,3	32.07	0.73
Mancozeb	0,05	0,6	266,51	2,3	32.07	0.72

Tableau II : concentrations des pesticides utilisés dans le mélange

2. Culture cellulaire et traitement

a- Cellules utilisées

Les MSC ont été fournies par la CHRU de Tours. Elles proviennent de dons de moelle osseuse de donneurs jeunes (25-35 ans). Les consentements oraux des patients ont été obtenus. Elles ont été cultivées dans du milieu MEM (Alpha-Minimum Essential Medium) supplémenté par 20% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de glutamax, alternative à la glutamine contenant 200 mM de dipeptide L-alanyl-L-glutamine dans une solution à 0,85% NaCl, du FGF (Fibroblast Growth Factor) (1,5 ng/mL) et une solution de pénicilline/streptomycine (aux concentrations respectives de 100 U/mL et 100 μg/mL). Le milieu a été changé tous les 2-3 jours. Les MSC ont été utilisées au maximum jusqu'au 6^{ème} passage.

Les primocultures de GBM sont issues d'exérèses tumorales réalisées au CHU de Nantes. La primoculture utilisée, COXCa, est constituée de cellules semi-adhérentes de sous-type pro-neural. Elle a été cultivée dans du milieu défini sans sérum afin de conserver l'hétérogénéité tumorale, en particulier, les cellules souches cancéreuses. Ce milieu défini est le milieu DMEM/F-12 supplémenté par 40 ng/mL de FGF, 40 ng/mL d'EGF, 2 μg/mL d'héparine, du supplément N2 1x, du supplément B27 1x, 100 U/mL de pénicilline et 100 μg/mL de streptomycine. 70% du milieu a été changé tous

les 2-3 jours.

Les cellules ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ en atmosphère humide.

b- Obtention du milieu conditionné de 48h de COXCa

Les cellules tumorales ont étéensemencées dans des boîtes de pétri Falcon de 100 mm à une densité de 500 000 cellules par flasque dans 10 mL de milieu défini. Lorsque les cellules COXCa étaient à 90% de confluence, la totalité du surnageant était récupérée, centrifugée 5 min à 2000 rpm (rotation par minute) pour éliminer les cellules en suspension, aliquotée et congelée à -80°C : obtention du milieu conditionné (MC) de 48h de COXCa.

c- Exposition des MSC/CAF au mélange de pesticides et co-culture

Les MSC ont été cultivées dans des flacons Falcon de 75 mm² à une densité de 150 000 cellules par flasque dans 10 mL de milieu MEM. Après 24h, les cellules ont été exposées (MSC ADI) ou non (MSC) au mélange de pesticides pendant 21 jours.

A J19, pour 48h, les MSC ont été cultivées en milieu défini sans sérum. Parallèlement, à J19 certaines flasques de MSC ont été cultivées pour 48h en présence de 30% de milieu conditionné de primoculture gliale afin de transformer les MSC en CAF spécifiques de cette primoculture.

A J21, les MSC ou CAF +/- ADI ont été quantifiés et soit co-cultivés avec des cellules tumorales soit maintenus dans du milieu défini. La co-culture cellules stromales-cellules tumorales a été réalisée dans un rapport 1 : 4 (4 fois plus de cellules tumorales) pendant 6 jours dans 10 mL de milieu défini. En parallèle, des MSC et CAF +/-ADI ont été cultivés dans du milieu défini de J22 à J27 afin de recueillir du MC dépourvu de sérum et de pesticide. A J24 et J26, le milieu des MSC et CAF +/-ADI a été récupéré, centrifugé 5 min à 2000 rpm, aliquoté et congelé à -80°C : obtention de milieu conditionné (MC) de MSC et CAF +/-ADI de 72 et 48h (Figure 5).

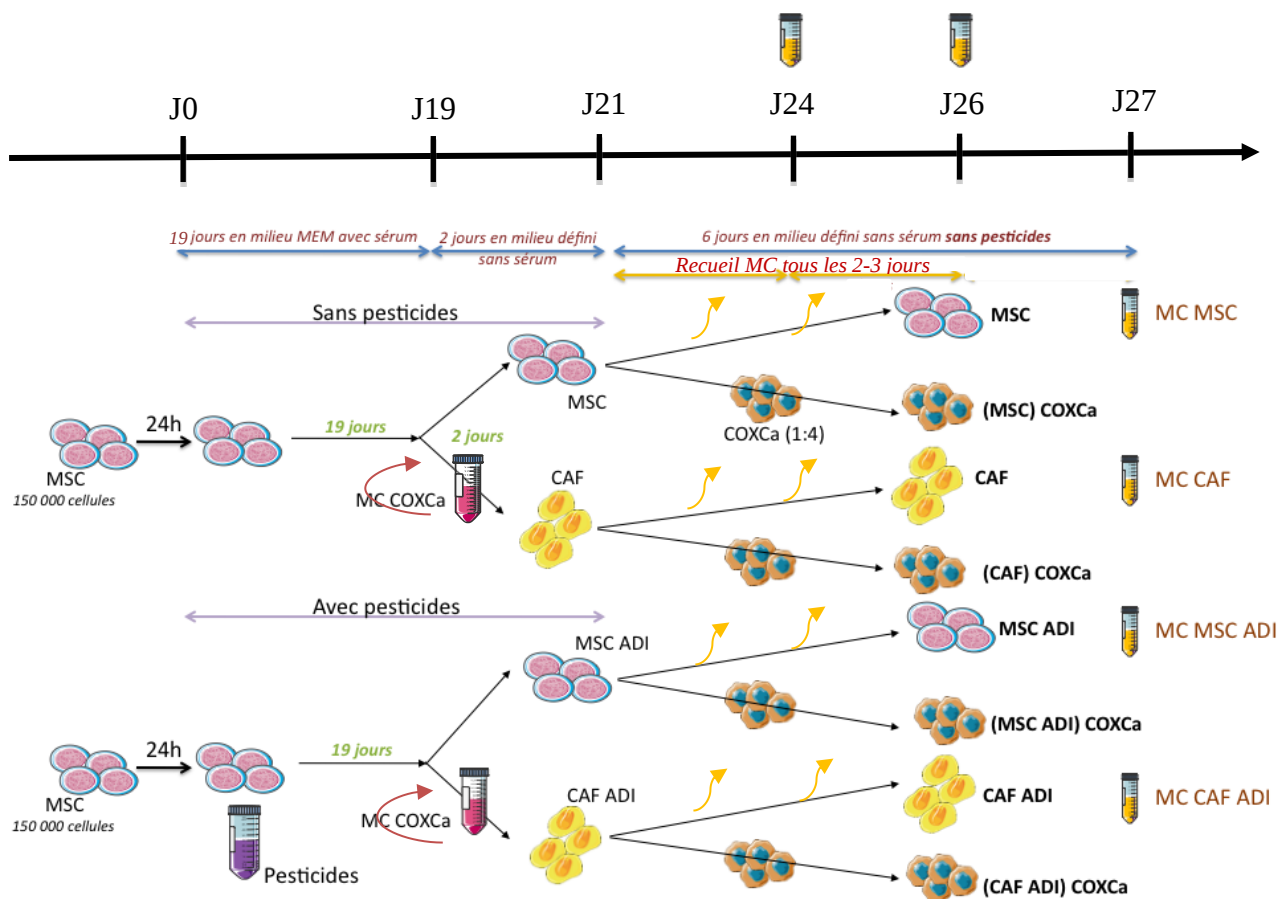


Figure 5 : protocole de co-culture et obtention des milieux conditionnés MC MSC, MC CAF, MC MSC ADI, MC CAF ADI

d- Analyse des marqueurs de surface des MSC et CAF par FACS

Au terme des 21 jours de culture des MSC ou CAF en présence ou non de pesticides, les cellules ont été récupérées par action de l'accutase, quantifiées par comptage au Bleu Trypan et ensemencées dans une plaque 96 puits. L'analyse de l'expression des marqueurs CD73, CD90, CD105, CD14, CD20, CD34 et CD45 a été réalisée par FACS grâce au kit MSC Phenotyping kit (Miltenyi Biotec). Pour chaque condition, deux marquages ont été réalisés : 100 000 cellules ont été marquées par le MSC Phenotyping Cocktail (CD73-APC, CD90-FITC, CD105-PE, CD14-PerCP, CD20-PerCP, CD34-PerCP et CD45-PerCP dilués au 15^{ème} dans du PSB BSA 1%) et 100 000 par l'Isotype Control Cocktail (IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-APC, IgG1-PerCP, IgG2a-PerCP dilués au 15^{ème} dans du PBS BSA 1%). La plaque a été centrifugée 1 min à 700 rcf (force centrifuge relative), le surnageant a été jeté et les cellules ont été reprises par 100 µL de MSC Phenotyping Cocktail ou d'Isotype Control Cocktail. La plaque a alors été incubée 1 h, sur glace, à l'abri de la lumière. Puis la plaque a été centrifugée 1 min à 700 rcf, le surnageant a été jeté et les culots ont été repris par 100 µL de PBS

BSA 1%.

L'étude du marquage de CD10 a été effectuée grâce au fluorochrome BV421 : 100 000 cellules ont été incubées avec 100 μ L d'anticorps anti CD10-BV421 (dilué au 100^{ème} dans du PBS BSA 1%) et 100 000 avec l'isotype contrôle.

La lecture a été effectuée par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur FACS Canto (BD Biosciences, France). Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel FlowLogic (Miltenyi).

e- Analyse de la résistance des cellules gliales cancéreuses (co-cultivées avec des MSC ou CAF +/-ADI) au traitement par témozolomide

Lors des 6 jours de co-culture MSC ou CAF +/- ADI - cellules tumorales gliales, certaines flasques ont été exposées à deux concentrations de TMZ : 200 μ M et 400 μ M. Les flasques contrôles ont été exposées à un volume correspondant de DMSO. A la fin des 6 jours de culture, les cellules tumorales ont été décollées des boîtes avec de l'acutase. Leur prolifération et leur viabilité ont été analysées par comptage au Bleu Trypan.

f- Impact des milieux conditionnés de MSC ou CAF +/-ADI sur les primocultures de glioblastome humain

Les cellules tumorales ont étéensemencées dans des boîtes de pétri Falcon de 100 mm à une densité de 500 000 cellules par boîte dans 10 mL de milieu défini. Après 24h de prolifération, le milieu a été changé, et remplacé par 7 mL de milieu défini associé à 3 mL de milieu conditionné de MSC ou CAF +/- ADI pour trois jours de culture (Figure 6).

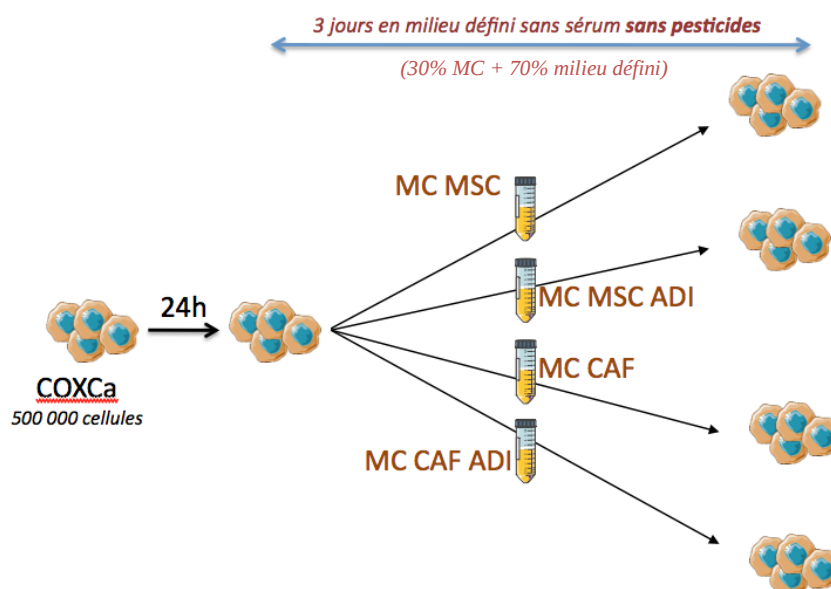


Figure 6 : démarche expérimentale – exposition d’une primoculture gliale aux MC de MSC, CAF +/-ADI

g- Exposition directe de la primoculture gliale au mélange de pesticides

Les cellules tumorales ont été ensemencées dans des boîtes de pétri Falcon de 100 mm à une densité de 200 000 cellules par boîte dans 10 mL de milieu défini. Après 24h de prolifération, une boîte n’a pas été exposée aux pesticides mais a reçu le volume correspondant de DMSO (puits COXCa), une boîte a été exposée aux pesticides à la dose %ADI (puits COXCa %ADI) et une autre boîte à la dose 3ADI (puits COXCa 3ADI). Ces cellules ont été cultivées pendant 21 jours.

h- Analyse de la résistance au traitement par témozolomide des cellules gliales cancéreuses exposées directement aux pesticides par test au Prestoblue®

Au terme des 21 jours d’exposition aux pesticides, les cellules tumorales (COXCa, COXCa %ADI, COXCa 3ADI) ont été récupérées par action de l’acutase, centrifugées, comptées au Bleu Trypan et réensemencées dans des plaques 96 puits Falcon. Le taux d’ensemencement par puits était adapté au délai de culture : avoir suffisamment de cellules en fin de culture pour pouvoir réaliser le test au Prestoblue ; ne pas atteindre le taux de confluence trop tôt, confluence qui limiterait la multiplication des cellules et donc biaiserait le résultat (Tableau III). Dès le lendemain de l’ensemencement, les cellules étaient exposées à différentes concentrations de TMZ (0, 200 et 400 μ M) pendant différents délais (3 jours, 6 jours, 10 jours et 12 jours).

Durée d'exposition au témozolomide	3 jours	6 jours	10 jours	12 jours
Nombre de cellules à ensemercer par puits (100 µL)	10 000	5 000	2 000	1 000

Tableau III : taux d'ensemencement cellulaire en fonction du temps d'exposition au témozolomide

70% de milieu a été changé tous les 2-3 jours. Pour de ne pas perdre les cellules mortes ou sénescents, la plaque était centrifugée (1 min - 700 rcf) avant le changement de milieu. Après 3, 6, 10 ou 12 jours d'exposition au TMZ, le taux de prolifération des cellules a été déterminé par test au Prestoblu[®] (Invitrogen), un dosage colorimétrique : 10 µL du réactif Prestoblu[®] étaient ajoutés dans chaque puits. La plaque était conservée 3 heures, à 37°C, en présence de CO₂ et à l'abri de la lumière. La lecture spectrophotométrique était ensuite faite à 570 nm.

3. Étude de l'expression des protéines par Western-blot

Extraction des protéines :

Les cellules ont été récupérées par action de l'acutase, lavées avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min. Les culots cellulaires ont été utilisés pour l'extraction des protéines totales.

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (contenant 40 µg/mL d'une solution d'inhibiteur de protéases) et par sonication (10 cycles 30s « on », 30s « off »), puis centrifugées (13 000 rpm, 15 min, 4 °C). Un dosage protéique colorimétrique a été effectué sur le surnageant, maintenu sur glace, grâce au kit BCA (Bicinchoninic Acid Kit) Protein Assay. La lecture spectrophotométrique s'est faite à 562 nm. La concentration en protéines a été déterminée grâce à la réalisation d'une gamme étalon (0 à 20 µg/mL) d'albumine sérique bovine

Analyse de l'expression protéique :

Les protéines (50 µg) ont été mélangées à du tampon de charge, puis dénaturées 5 min à 95 °C.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse de zone en condition dénaturante (SDS-PAGE). Pour cela, un gel de polyacrylamide à 12% ou 15% a été utilisé. La migration a été réalisée à 50 puis 100V dans du tampon de migration jusqu'à ce que le bleu de bromophénol, colorant du tampon de charge, sorte du gel.

Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). Préalablement, cette membrane a été trempée successivement dans des bains de méthanol, d'eau et de

tampon de transfert. Le gel de polyacrylamide a été également placé quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis au contact de la membrane. Le transfert s'est effectué durant 1h30 à 30V. Une fois le transfert réalisé, la membrane a été incubée 1h30 sous agitation dans du tampon de blocage (PBS 1X/Lait en poudre 5 %) afin de saturer les sites aspécifiques. La membrane a alors été incubée une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire (Tableau IV) dilué dans du PBS 1X-Tween 0,1%/BSA 1%. La membrane a ensuite été lavée 3 fois 15 minutes dans du tampon de lavage (PBS 1X/Tween 0,1 %) afin d'éliminer l'excès d'anticorps primaire, puis incubée 1h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase et dilué dans du PBS 1X-Tween 0,1%/BSA 1%. La membrane a enfin été de nouveau lavée 3 fois 15 minutes dans le tampon de lavage (PBS 1X/Tween 0,1 %) afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. La révélation a été effectuée grâce à l'utilisation du système Luminata Forte (Millipore), substrat de la peroxydase, sur l'appareil Bio-Rad et grâce au logiciel Image Lab™.

Anticorps	Hôte	Fournisseur	Dilution	Taille (kDa)
ACTINE	Souris	Millipore	1/10 000	42
BAX	Lapin	Pharmingen	1/1000	20
BCL-XL	Lapin	Novus	1/1000	30
NANOG	Lapin	Abcam	1/500	35
SALL 4	Souris	Abcam	1/500	112
SOX 2	Lapin	Active motif	1/1000	42
SURVIVINE	Lapin	Abcam	1/1000	16
β-TUBULINE	Souris	Abcam	1/10 000	52

Tableau IV : anticorps primaires utilisés

4. Analyse du métabolisme par technique Seahorse®

Au terme des 6 jours de co-culture ou des 3 jours d'exposition au MC, les cellules tumorales ont été récupérées après action de l'accutase. Les métabolismes oxydatif et glycolytique des cellules tumorales ont été étudiés grâce à l'appareil Seahorse® XF24 Flux Analyzer (Agilent). 24 heures avant de réaliser l'analyse Seahorse, chaque puits de la cartouche Seahorse contenant une sonde mesurant la vitesse de consommation d'oxygène (métabolisme oxydatif) et une autre, la vitesse d'acidification du milieu (métabolisme glycolytique), a été réhydraté par 1 mL de XF calibrant. La cartouche, fermée

hermétiquement, a été conservée à 37°C dans une étuve sans CO₂. Pour permettre l'adhésion des cellules tumorales COXCa semi-adhérentes, chaque puits de la plaque de culture XF-24 a été pré-incubé 20 minutes avec du CellTakTM (BD-Bioscience). Ensuite, 50 000 cellules ont étéensemencées dans chaque puits dans du milieu DMEM, sans bicarbonate, supplémenté avec du glucose 10 mM, du pyruvate 1 mM et de la glutamine 2 mM. Le pH de ce milieu a été ajusté à 7,5 par ajout de NaOH. Pour déterminer les paramètres mitochondriaux, la vitesse de consommation d'oxygène (OCR « Oxygen Consumption Rate ») a été mesurée initialement puis après injection d'etomoxir (ETX) 40 µM, inhibiteur de la carnitine palmytransférase (CPT1), enzyme clef de la lipolyse intervenant dans l'étape initiale du transfert des Acyl-CoA dans la mitochondrie ; d'UK5099 ((E)-2-cyano-3-(1-phenylindol-3-yl)prop-2-enoic acide) 2 µM, inhibiteur du mitochondrial pyruvate carrier (MPC) ; de BPTES (Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide) 10 µM, inhibiteur de la glutaminase transformant la glutamine en glutamate et de Roténone-Antymicine 1 µM, inhibiteurs de la chaîne respiratoire (Figure 7). La différence entre l'OCR avant injection et l'OCR après injection de l'inhibiteur, a permis de déterminer l'importance des différentes voies dans la respiration mitochondriale. Pour étudier la glycolyse, la vitesse d'acidification du milieu (ECAR) a été mesurée en basal.

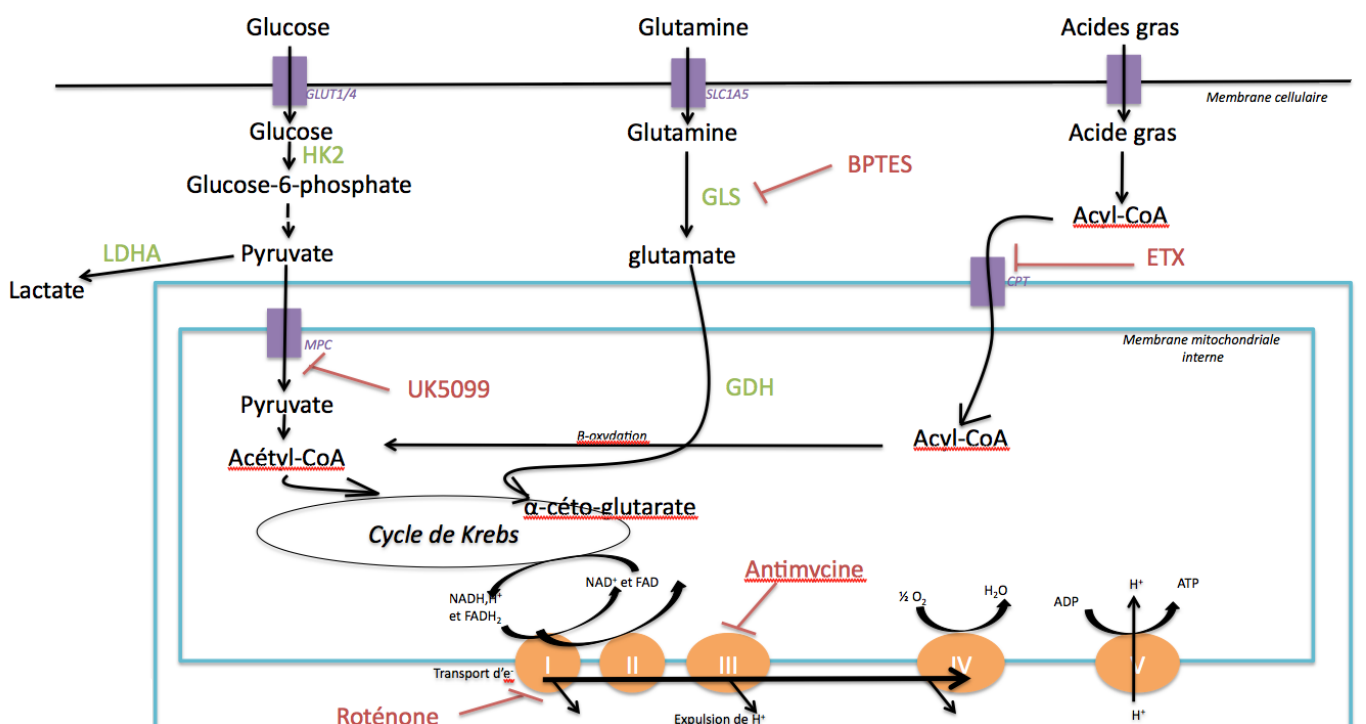


Figure 7 : exploration de la respiration mitochondriale

5. Analyse du cycle cellulaire

Au terme des 6 jours de co-culture ou des 3 jours d'exposition au MC, les cellules tumorales ont été décollées par action de l'acutase, centrifugées (5 min-1000 rpm), reprises dans 1 mL de PBS 1X. En parallèle, une « solution de coloration de lyse » a été préparée par dilution du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole - colorant) au 1/50^{ème} dans du tampon de lyse (permettant la perméabilisation des cellules par lyse acide). 20 µL de la suspension cellulaire ont été mélangés à 20 µL de cette solution de coloration de lyse. Après 5 min d'incubation à 37°C, la réaction a été stoppée par ajout de 20 µL de tampon de stabilisation et la lecture effectuée grâce au protocole Two-Step Cell Cycle Analysis du Nucleocounter 3000 (ChemoMetec).

6. Dosage de la chemokine CCL5 dans le MC de MSC et CAF, exposés ou non aux pesticides, par test ELISA

Le dosage de CCL5, chemokine impliquée dans l'invasivité tumorale, a été réalisé sur les MC de 72h de MSC, MSC ADI, CAF et CAF ADI grâce au kit Quantikine® Elisa (R&D Systems). Dans chaque puits de la plaque 96 puits a été fixé un anticorps monoclonal dirigé contre la chemokine CCL5 humaine. Une gamme étalon a été préparée avec de la CCL5 humaine. 100 µL d'échantillons et de gamme étalon ont été ajoutés dans les puits. Un triplicat a été réalisé pour chaque échantillon et point de gamme. La plaque a alors été incubée 2 h à température ambiante puis lavée 3 fois afin d'éliminer tout ce qui n'a pas été retenu par l'anticorps anti-CCL5. Puis 200 µL d'anticorps anti-CCL5 couplé à une enzyme (HRP – horseradish peroxydase) ont été ajoutés. La plaque a été incubée 1 h à température ambiante et 3 nouveaux lavages ont été réalisés pour éliminer l'excès d'anticorps anti-CCL5 HRP non fixé. 200 µL d'une solution contenant le substrat de la HRP et une substance chromogène ont été ajoutés. Au cours des 20 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, une coloration bleue, proportionnelle à la quantité de CCL5 fixée, est apparue. La réaction a été stoppée par ajout de 50 µL d'acide sulfurique. La densité optique a été lue à 450 nm contre une longueur d'onde de correction de 560 nm. La teneur en CCL5 dans les échantillons a alors était déterminée grâce à la gamme étalon. Cette teneur a été rapportée au nombre de cellules correspondant au MC.

7. Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité mesure la capacité des cellules à proliférer et à former des clones après un traitement cytotoxique.

Au terme des 6 jours de co-culture, en présence ou non de TMZ à la concentration de 200 ou 400 μM , les cellules ont été décollées par action de l'accutase. Les cellules ont alors été comptées et réensemencées dans une plaque 96 puits selon le principe suivant (Figure 8) :

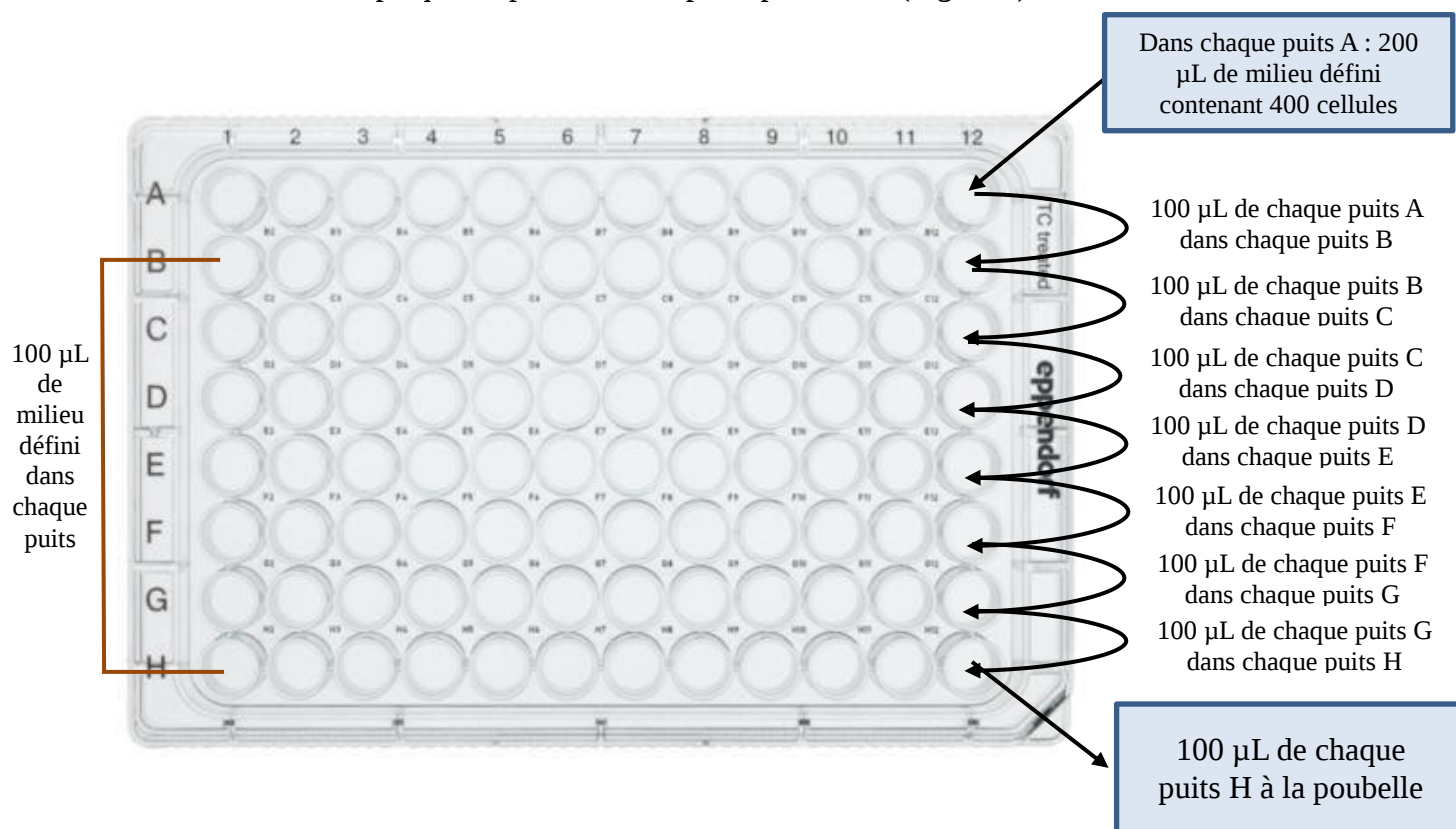


Figure 8 : protocole de dilution limitante

8. Analyse statistique

Le nombre de réplicats « n » est précisé pour chaque expérience. Les résultats ont été analysés par comparaison des moyenne $\pm$ SEM (Standard Error of the Mean) grâce aux tests one-way Anova (test de Tukey) ou Mann Whitney. Ces analyses ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism®. Les différences avec un $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$).

B. Résultats

1. Impact des pesticides sur les cellules stromales et induction des CAF

Dans le but de mimer l'exposition chronique de la population aux mélanges de pesticides et d'évaluer l'impact de ces xénobiotiques sur la relation microenvironnement tumoral-cellules cancéreuses, des MSC ont été exposées à un mélange de 7 pesticides pendant 21 jours (MSC ADI).

Après 19 jours d'exposition aux pesticides, certaines flasques de MSC ont été cultivées pendant 48h en présence de MC de cellules tumorales dans le but de les transformer en CAF. A J21, l'expression de marqueurs de surface caractéristiques des MSC ainsi que celle de CD10, marqueur permettant de caractériser les CAF, a été étudiée (Figures 9 et 10).

a- Les pesticides ne modifient pas l'expression des marqueurs de surface des MSC et CAF

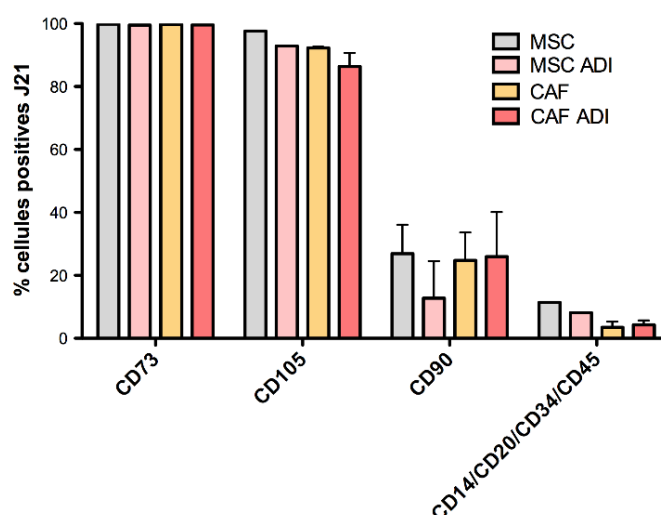


Figure 9 : étude par FACS des marqueurs de surface des MSC et CAF après 21 jours d'exposition aux pesticides

Analyse des marqueurs de MSC CD73, CD105, CD90, CD14, CD20, CD34 et CD45 dans les MSC et CAF exposés ou non aux pesticides. (n=2)

Les cellules exposées ou non aux pesticides présentent une expression des marqueurs sélectionnés CD73, CD105 et CD90. CD90, bien que plus faiblement exprimé, reste d'expression constante quel que soit le traitement. L'expression des marqueurs CD14, CD20, CD34 et CD45, marqueurs de contrôle négatif, est quasi nulle et non modifiée par les traitements (Figure 9).

L'exposition au mélange de pesticides n'altère donc pas le phénotype des cellules stromales.

b- Le milieu conditionné (MC) de cellules tumorales COXCa induit l'expression de CD10, marqueur caractéristique de CAF

Il est aujourd'hui établi que le stroma tumoral renferme une population hétérogène de CAF induite par les effets directs (contact) et indirects (sécrétome) des cellules de la tumeur sur les cellules du microenvironnement tumoral. Afin de reconstruire un modèle de co-culture similaire à la réalité, les MSC ont été cultivées en présence de 30% de MC de cellules tumorales gliales COXCa pendant 48h en vue de les activer en CAF.

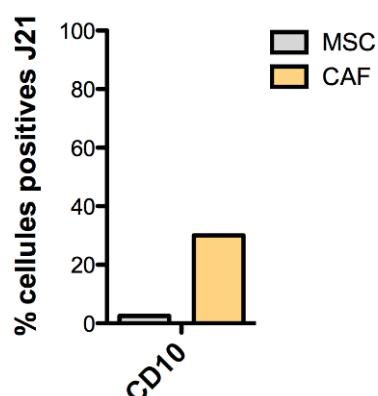


Figure 10 : étude par FACS du marqueur de surface CD10 après 21 jours de culture

Etude de l'expression du marqueur d'activation CD10 chez les MSC et CAF. (n=1)

Le taux d'expression du marqueur CD10 est de 2.5% pour les MSC alors qu'il est de 30% pour les CAF (Figure 10).

Le MC de culture primaire de cellules gliales tumorales induit l'activation des MSC en CAF comme l'atteste l'induction du marqueur CD10.

c- Les pesticides freinent la prolifération des MSC sans pour autant modifier leur viabilité

Les MSC ont étéensemencées à un taux de 150 000 cellules par flasque et exposées pendant 21 jours aux pesticides. Nous avons évalué, dans un premier temps, l'impact de cette exposition chronique au mélange de pesticides sur la morphologie, la prolifération et la viabilité des cellules stromales.

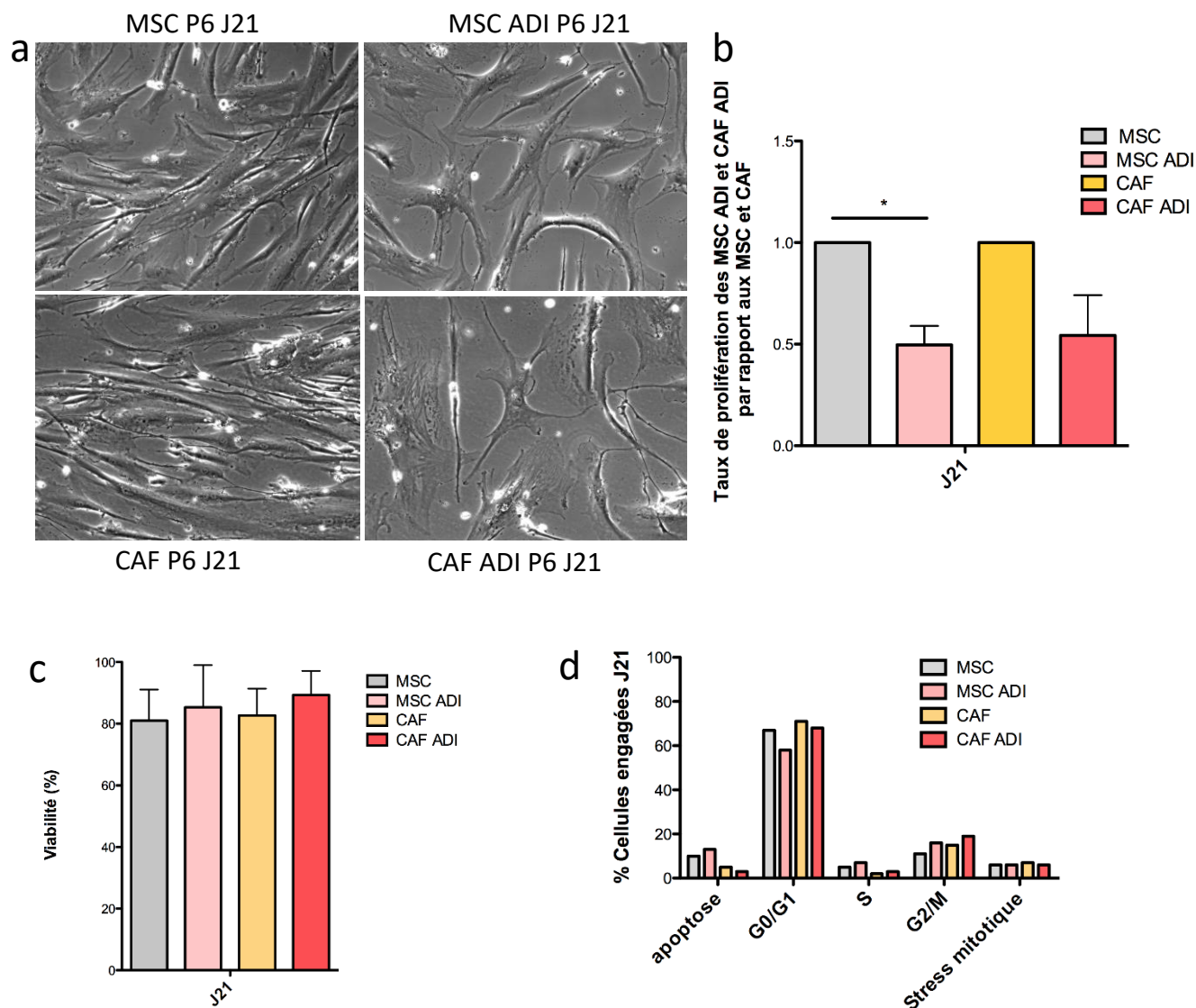


Figure 11 : effets des pesticides sur les MSC et CAF

Les cellules ont étéensemencées à un taux de 150 000 cellules par flasque à J0 et cultivées pendant 21 jours en présence (MSC ADI et CAF ADI) ou non de pesticides (MSC et CAF). **a**- Photos réalisées au microscope Zeiss observer Z1 (objectif x10) après 21 jours de culture. (n=3) **b**- Taux de prolifération (par comptage au Bleu Trypan) à J21 (n=3) Test de Tukey (Anova) : $p < 0,05$ **c**- Viabilité par test d'exclusion au Bleu Trypan. (n=3) **d**- Cycle cellulaire à J21. (n=1)

Le traitement par pesticides ne modifie pas la morphologie cellulaire (Figure 11a). Toutefois, ce traitement freine la prolifération des MSC et CAF (Figure 11a et 11b) mais n'altère pas leur viabilité (Figure 11c), confirmant ce qui a été montré par Hochane *et al.* en 2017.

La capacité proliférative des MSC ADI et CAF ADI étant diminuée, l'étude de leur cycle cellulaire à J21 paraissait intéressante. Le test, réalisé une seule fois, ne montre pas de différence sur cet essai unique (Figure 11d).

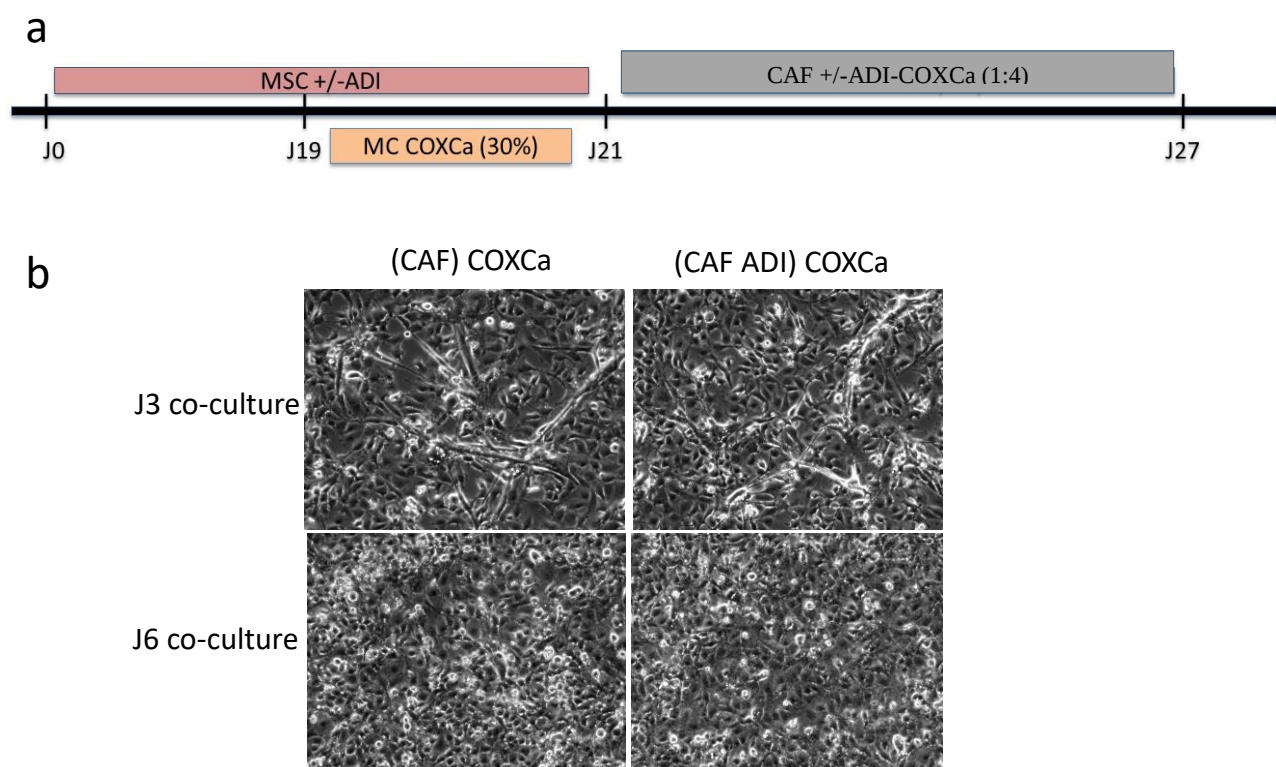
2. Impact de la co-culture CAF (+/- pesticides)-cellules tumorales gliales

Nous avons ensuite évalué l'impact de la modification de ces acteurs clefs (MSC et CAF) du microenvironnement tumoral sur les capacités prolifératives, métaboliques et sur la sensibilité au traitement de référence (TMZ) des cellules tumorales. Pour cela, un modèle de co-culture a été réalisé. Compte tenu de l'impact du sécrétome des cellules tumorales sur les MSC au sein de la niche pour les transformer en CAF, nous avons choisi de ne présenter ici que les résultats des co-cultures CAF +/-ADI-cellules tumorales gliales COXCa.

Afin d'étudier l'impact direct des CAF pré-exposés aux pesticides sur les cellules tumorales gliales, nous avons réalisé une co-culture CAF +/-ADI-cellules tumorales COXCa pendant 6 jours comme définie par Oliver L. et *al.* (publication en préparation).

a- Les CAF pré-exposés aux pesticides, dans un modèle de co-culture avec COXCa, ne modifient ni la prolifération, ni la viabilité des cellules tumorales gliales

Pour étudier l'impact de la co-culture de CAF pré-exposés aux pesticides sur la prolifération et la viabilité des cellules tumorales gliales (Figure 12a), nous avons comparé, par comptage au Bleu Trypan, le nombre de cellules tumorales à J21 (J21 = début de la co-culture = J0 co-culture) au nombre de cellules à J27 (J27 = fin de la co-culture = J6 co-culture) en présence de CAF pré-exposés ou non aux pesticides.



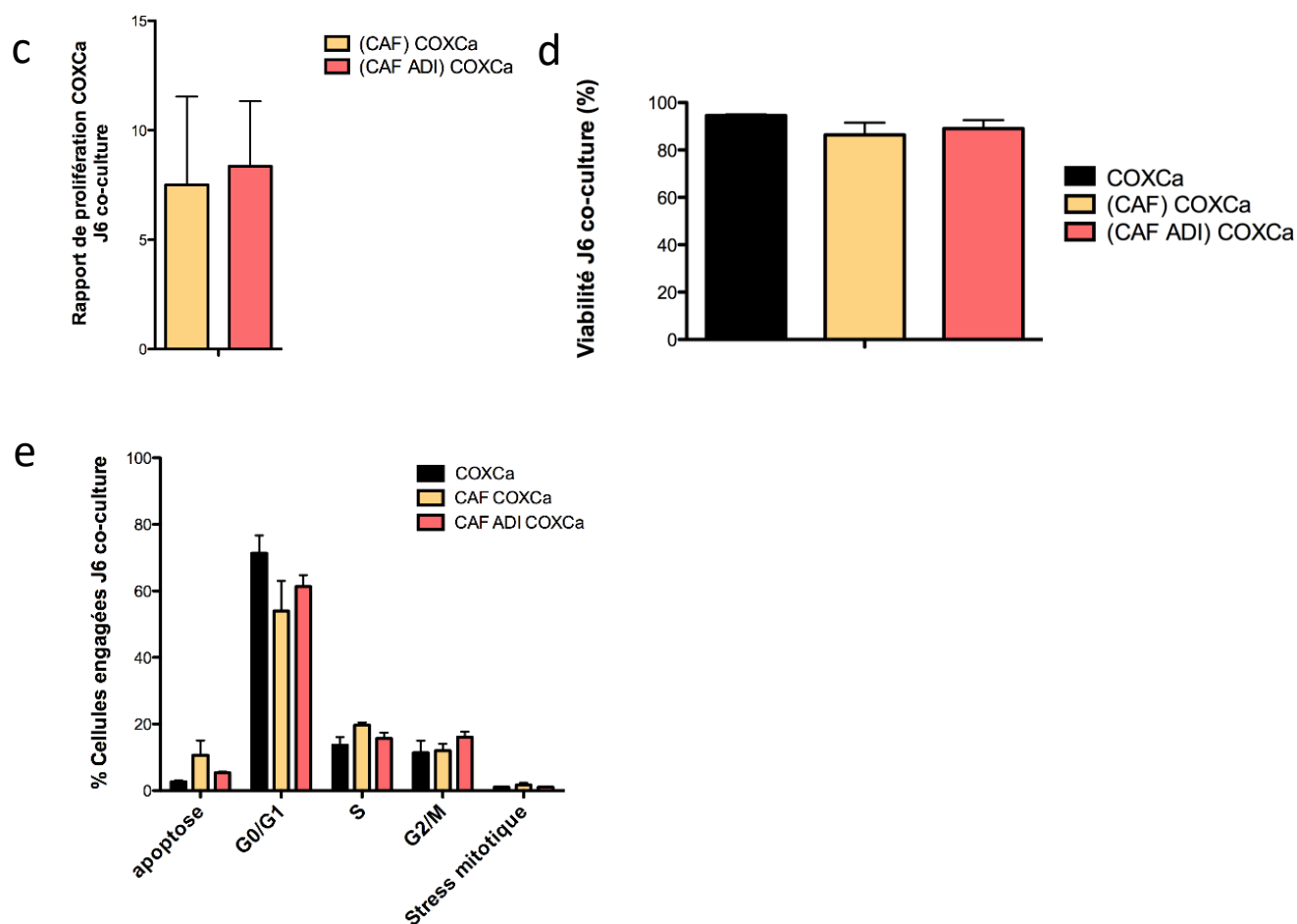


Figure 12 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur la prolifération et la viabilité des cellules tumorales gliales COXCa

a- Schéma de l'expérimentation. Les MSC ont été cultivées pendant 19 jours en présence (MSC ADI) ou non de pesticides (MSC) avant d'être différenciées en CAF par exposition pendant 48h au MC de COXCa. A J21, les CAF ont été mis en co-culture avec les cellules COXCa dans un rapport 1:4 pendant 6 jours dans un milieu défini sans pesticide. **b-** Photos réalisées au microscope Zeiss observer Z1 (objectif x10) après 3 et 6 jours de co-culture. (n=3) **c-** Taux de prolifération (par comptage au Bleu Trypan) des cellules COXCa après 6 jours de co-culture par rapport au taux d'ensemencement à J0 de la co-culture. (n=3) **d-** Viabilité des cellules tumorales COXCa par test d'exclusion au Bleu Trypan après 6 jours de co-culture. (n=3) **e-** Cycle cellulaire des cellules COXCa après 6 jours de co-culture. (n=3)

Il a déjà été établi que la co-culture de cellules stromales avec des cellules cancéreuses peut conduire à un phénomène de cytophagie facilitant la croissance des cellules tumorales (Molnar et *al.*, 2013). A J3 de la co-culture, dans ce rapport 1:4, des CAF et des CAF ADI sont encore présents. En revanche, après 6 jours de co-culture, nous n'observons plus de CAF ni de CAF ADI mais uniquement des cellules tumorales. Ainsi, après 6 jours de co-culture nous disposons d'une population de cellules tumorales COXCa « pure » ayant subi les effets potentiels des cellules stromales (Figure 12b).

La co-culture avec des CAF pré-exposés au mélange pesticides ne modifie ni la prolifération (Figure

12c) ni la viabilité (Figure 12d) des cellules tumorales. De la même façon, le cycle cellulaire des cellules COXCa ne semble pas affecté (Figure 12e).

b- La pré-exposition des CAF au mélange de pesticides impacte le niveau d'expression des marqueurs de cellules souches cancéreuses des cellules COXCa

Bien que la co-culture des cellules tumorales avec des CAF pré-exposés aux pesticides ne modifie ni la prolifération ni la viabilité des cellules tumorales, nous avons voulu évaluer l'impact de cette co-culture sur le niveau d'expression de marqueurs de cellules souches cancéreuses (CSC) dans la population COXCa. En effet, les CSC étant connues comme étant responsables de l'initiation, de la progression, de la récurrence tumorales et de la résistance au traitement (Dick, 2008), il paraît primordial de regarder si la proportion de CSC est modulée par cette co-culture. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de 3 facteurs de transcription impliqués dans la maintenance des CSC : SALL 4, SOX 2 et NANOG.

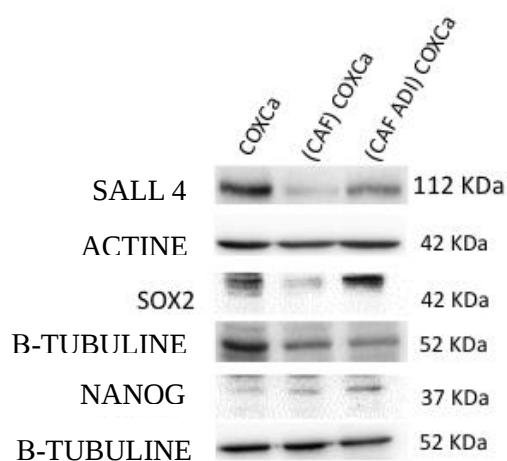


Figure 13 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur le caractère souche des cellules tumorales gliales COXCa

Après 6 jours de co-culture CAF +/-ADI-COXCa, les cellules ont été récupérées et l'expression protéique de SALL 4, SOX 2 et NANOG a été analysée par Western blot. (n=3)

La co-culture de COXCa avec des CAF induit une diminution de l'expression protéique des marqueurs SALL 4 et SOX 2. Lorsque les cellules stromales ont été pré-exposées aux pesticides avant leur mise en culture avec COXCa, la diminution de l'expression de SALL 4 est très atténuée et les facteurs SOX 2 et NANOG sont sur-exprimés (Figure 13).

c- Les CAF pré-exposés aux pesticides perdent leur rôle de protection des cellules tumorales face à un traitement chimiothérapique

Les modifications de la proportion de CSC sous l'effet d'un microenvironnement pré-exposé ou non aux pesticides nous a conduit à évaluer les effets sur la balance survie/apoptose et sur la réponse au traitement chimiothérapique de référence : le TMZ. Pour cela, la co-culture a été réalisée en présence de deux concentrations de TMZ (200 et 400 μ M) pendant 6 jours (Figure 14a). Le taux de prolifération des cellules COXCa et leur viabilité ont alors été analysés par comptage au bleu Trypan.

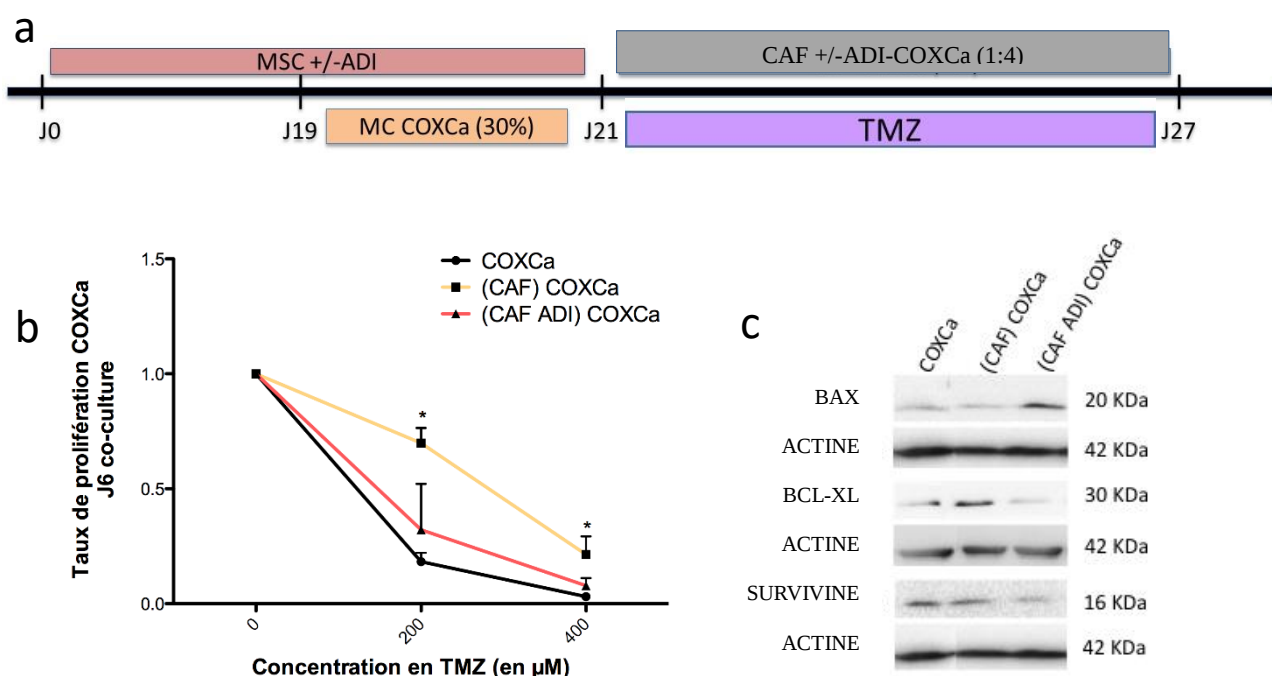


Figure 14 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur la sensibilité au TMZ des cellules tumorales

a- Schéma de l'expérimentation. Les MSC (transformées en CAF de J19 à J21) ont été cultivées pendant 21 jours en présence (CAF ADI) ou non de pesticides (CAF). A J21, la co-culture a été réalisée dans un rapport (1:4) et entretenue pendant 6 jours dans un milieu défini sans pesticide en présence d'une gamme de TMZ (0, 200 ou 400 μ M). **b-** Taux de prolifération (par comptage au Bleu Trypan) après 6 jours de co-culture en présence de témozolomide. (1 = taux de prolifération entre J0 co-culture et J6 co-culture dans les conditions contrôles) (n=3) Test de Mann Whitney : $p < 0,05$ **c-** Expression protéique, par Western-blot, des cellules COXCa au terme des 6 jours de co-culture. (n=3)

La co-culture des COXCa avec les CAF majore la résistance au traitement par TMZ, et ce significativement à 200 μ M et 400 μ M de TMZ. La pré-exposition des CAF aux pesticides semble induire la perte de soutien de la niche tumorale au traitement TMZ avec un retour d'une mortalité comparable à la population COXCa témoin cultivée seule (Figure 14b).

Compte tenu de ces observations, nous avons évalué l'expression de protéines intervenant dans la balance survie/apoptose. L'expression des protéines pro-apoptotique BAX et anti-apoptotiques BCL-XL et SURVIVINE a été étudiée par Western-blot (Figure 14c). La mise en co-culture des cellules COXCa avec les CAF induit une surexpression de BCL-XL. Les CAF protègent donc les cellules COXCa de la mort par apoptose. En revanche, les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF ADI sur-expriment la protéine pro-apoptotique BAX. Cette co-culture avec des CAF ADI entraîne également une perte de la sur-expression de BCL-XL et une sous-expression de la SURVIVINE. Les CAF ADI semblent rendre les cellules COXCa plus sensibles à la mort par apoptose. Ils favorisent même cette mort puisqu'on a une augmentation du rapport BAX/BCL-XL et une diminution de l'expression de la SURVIVINE.

d- L'exposition des cellules stromales aux pesticides altère leur impact sur la modification du métabolisme des cellules cancéreuses gliales

Les cellules stromales assurent un soutien prolifératif aux cellules cancéreuses et contribuent à définir un profil métabolique énergétique augmenté et favorable à la croissance de la tumeur (Shan et *al.*, 2017). A ce titre, nous avons souhaité étudier le métabolisme des cellules cancéreuses COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés ou non au mélange de pesticides.

Pour cela, nous avons mesuré, grâce à l'appareil Seahorse[®], la vitesse de consommation d'oxygène (OCR), reflet de la phosphorylation oxydative mitochondriale, et la vitesse d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR), reflet de la glycolyse. L'utilisation des inhibiteurs du CPT1 (ETX), du MPC (UK5099) et de la GLS (BPTES) a permis d'étudier l'importance respective des acides gras, du glucose et de la glutamine dans la respiration mitochondriale (Figure 7)

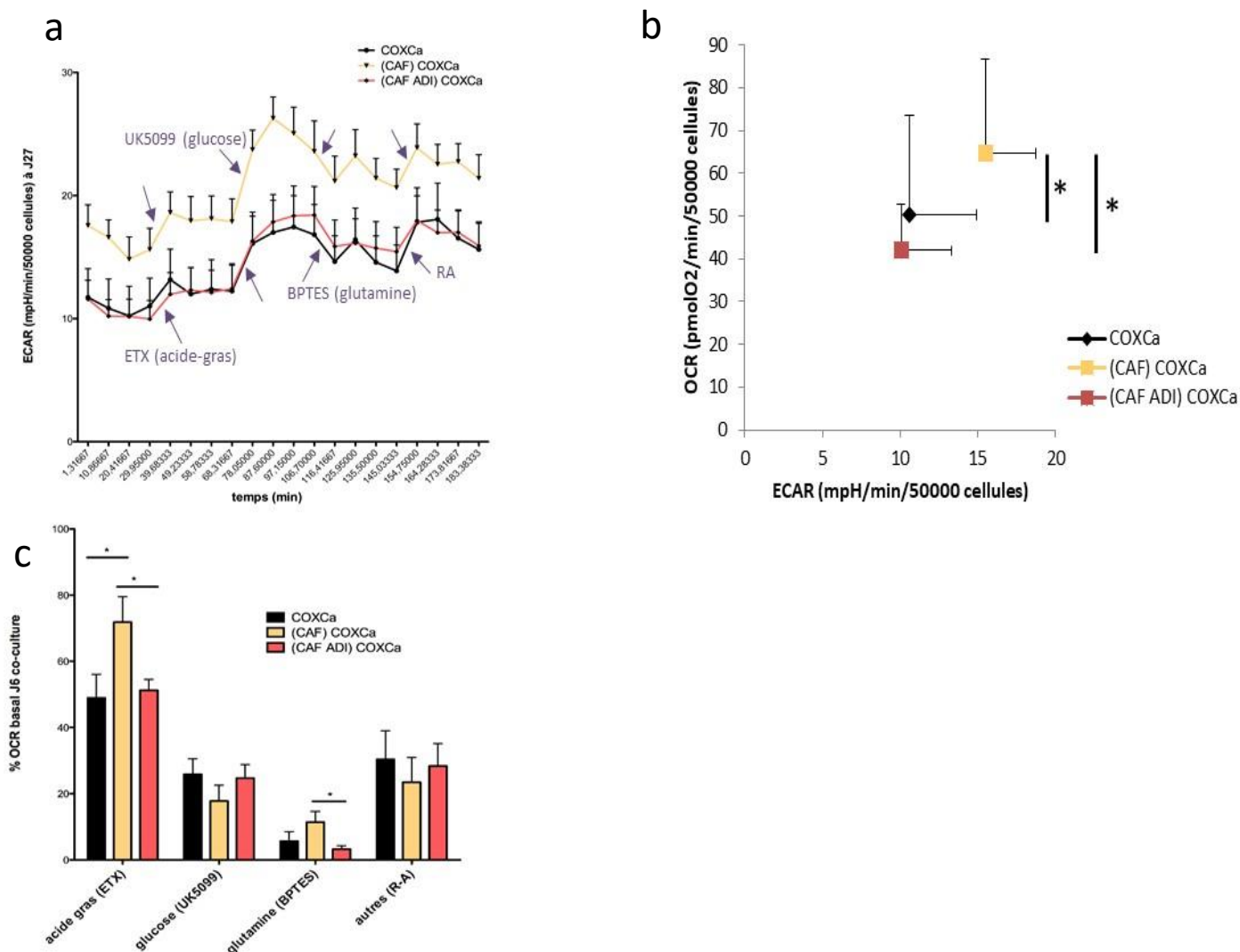


Figure 15 : effet de la co-culture CAF ADI-cellules tumorales sur le métabolisme des cellules tumorales gliales COXCa

Après 6 jours de co-culture, les cellules tumorales (très nettement à confluence) ont été récupérées et leur métabolisme a été analysé grâce à l'appareil Seahorse® XF24 Flux Analyzer. **a-** Métabolisme glycolytique des cellules COXCa, (CAF) COXCa et (CAF ADI) COXCa. (n=3) **b-** Métabolisme glycolytique (ECAR basal) et métabolisme oxydatif (OCR basal) de ces mêmes cellules. (n=3) **c-** Importance des différentes voies métaboliques dans la respiration mitochondriale. (n=3) Test de Mann Whitney *p<0,05

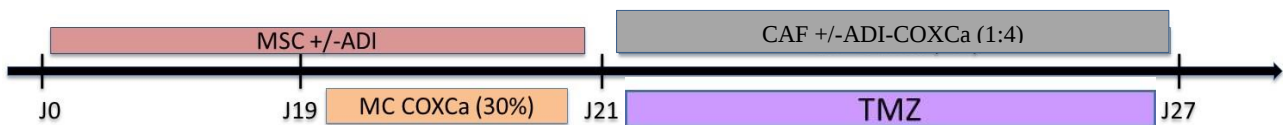
La co-culture (CAF) COXCa induit une augmentation du métabolisme global par rapport à la culture de cellules COXCa seules. Cette modification métabolique disparaît avec les CAF ADI (Figures 15a et 15b). En effet, l'ECAR basal et l'OCR basal de (CAF) COXCa sont supérieurs à ceux de COXCa et (CAF ADI) COXCa. Les cellules (CAF) COXCa semblent donc plus glycolytiques et plus oxydatives que les cellules COXCa et (CAF ADI) COXCa.

L'exploration par voie métabolique montre que les cellules COXCa utilisent pour leur respiration mitochondriale à 50% les acides gras, 25% le glucose et 5% la glutamine. En présence des cellules stromales CAF, on note une majoration de la phosphorylation mitochondriale des acides-gras (70%)

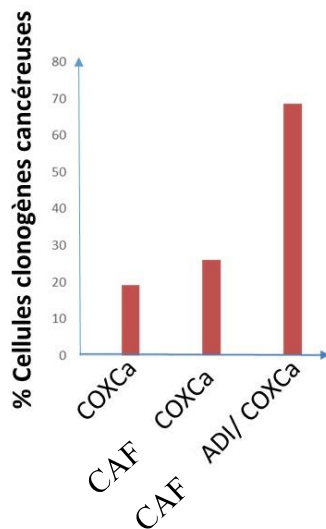
et de la glutamine (10%) et une diminution de celle du glucose (20%). Ce switch métabolique n'apparaît plus quand la niche est pré-exposée aux pesticides. Ainsi, on note une diminution significative de l'utilisation des acides-gras et de la glutamine pour la respiration des (CAF ADI) COXCa par rapport au (CAF) COXCa (Figure 15c).

e- Test de clonogénicité

a



b



c

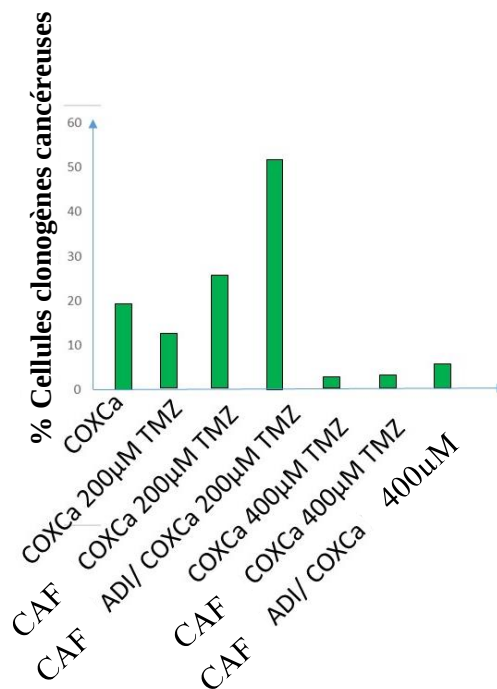


Figure 16 : les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides forment d'avantage de clones

a – Traitement des cellules avant la réalisation du test de clonogénicité. **b** - Impact de la préexposition aux pesticides des cellules stromales sur la capacité clonogène des cellules COXCa. **c** - Impact de cette capacité clonogène après un traitement chimiothérapique par témozolomide à 200 et 400 µM pendant 6 jours (n=1)

Les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF ADI forment 3 fois plus de clones que les cellules CAF COXCa (Figure 16b).

De même, après un traitement de 6 jours par du TMZ à la concentration de 200 µM, les cellules

COXCa co-cultivées avec des CAF ADI ont une capacité clonogène deux fois plus importante que les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF. Les résultats obtenus en présence d'une concentration de 400 μ M en TMZ ne sont pas interprétables : cette concentration était trop forte ou alors le taux de ré-ensemencement des cellules COXCa était trop faible pour permettre le développement de clone. Toutefois, là aussi, après un traitement par TMZ à la concentration de 400 μ M, les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF ADI semblent avoir une meilleure capacité clonogène, c'est-à-dire une meilleure capacité de prolifération après traitement chimiothérapeutique que les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF (Figure 16c).

3. Impact du milieu conditionné de CAF pré-exposés aux pesticides sur les cellules tumorales gliales

Après avoir étudié l'impact direct des CAF pré-exposés aux pesticides sur les cellules tumorales grâce à un modèle de co-culture, nous nous sommes focalisés sur l'impact des pesticides sur le sécrétome des cellules stromales, et les conséquences de ces modifications éventuelles sur les cellules cancéreuses COXCa. Pour cela, nous avons cultivé les cellules tumorales pendant 3 jours en présence de 30% de milieu conditionné (MC) de 48h de CAF pré-exposés (MC CAF ADI) ou non (MC CAF) aux pesticides pendant 21 jours. Il est à noter que ce MC ne contenait pas de pesticides (Figure 17).

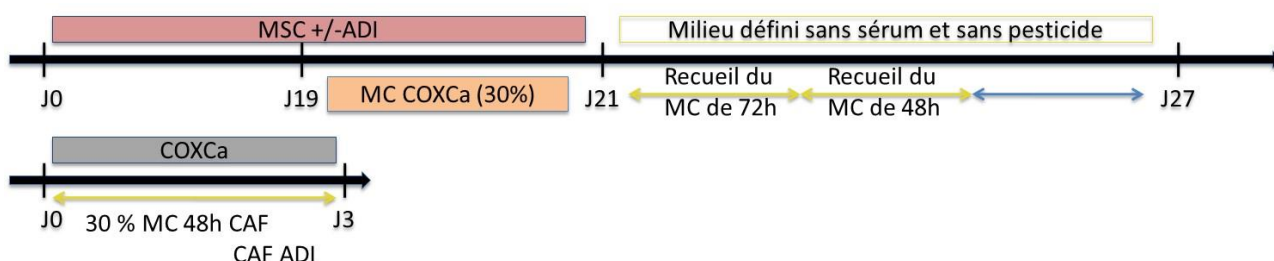


Figure 17 : schéma de l'expérimentation

Dans un premier temps, nous avons constaté que le MC de CAF pré-exposés aux pesticides ne modifiait ni la prolifération, ni la viabilité, ni la sensibilité au traitement des cellules tumorales. Il ne modifiait pas non plus l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la maintenance des CSC, ni celle des protéines régulant la balance survie/apoptose. En revanche, il modifie le métabolisme des cellules tumorales gliales de façon comparable aux co-cultures.

La congélation des MC pourrait constituer une source d'explication possible quant à ce faible effet du MC, un changement des conditions de test est donc à prévoir pour la poursuite des études.

a- Le MC de CAF pré-exposés ou non aux pesticides semble modifier le métabolisme des cellules tumorales gliales

Comme pour le modèle co-culture, nous avons étudié l'impact du MC de CAF pré-exposés aux pesticides sur le métabolisme grâce à l'appareil Seahorse® et à l'utilisation des inhibiteurs du CPT (ETX), du MPC (UK5099) et de la GLS (BPTES).

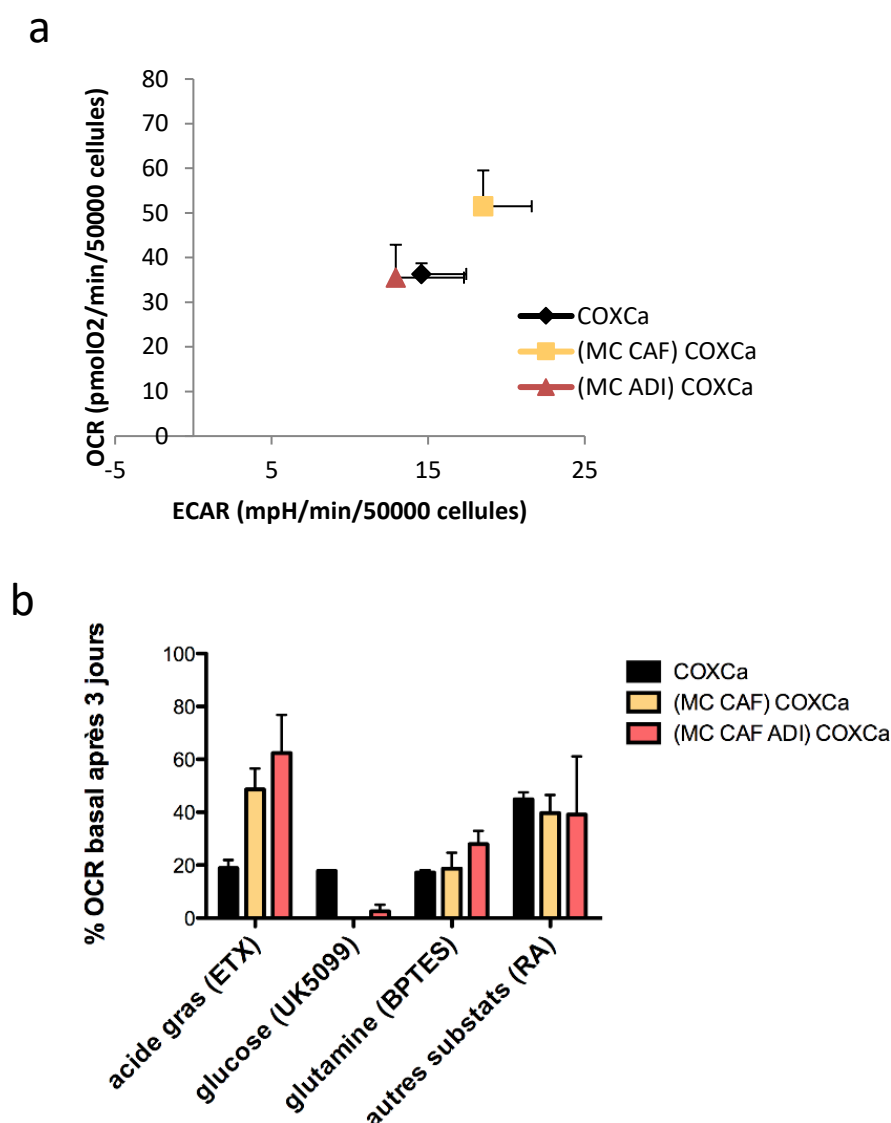


Figure 18 : effet du MC de CAF pré-exposés aux pesticides (MC CAF ADI) sur le métabolisme des cellules tumorales gliales COXCa

Les cellules tumorales COXCa ont été exposées pendant 3 jours à 30% MC de CAF +/-ADI. Puis, elles ont été récupérées et leur métabolisme a été analysé grâce à l'appareil Seahorse® XF24 Flux Analyzer **a-** Métabolisme glycolytique basal (ECAR) et métabolisme oxydatif basal (OCR) des cellules COXCa, (MC CAF) COXCa et (MC CAF ADI) COXCa. (n=1) **b-** Importance des différentes voies métaboliques dans la respiration mitochondriale. (n=1)

Comme pour la co-culture, les cellules (MC CAF) COXCa semblent être plus oxydatives et plus glycolytiques que les cellules COXCa et (CAF ADI) COXCa. La pré-exposition des cellules stromales aux pesticides semble conduire à la perte de ce soutien métabolique (Figure 18a). Les cellules (MC CAF) COXCa et (MC CAF ADI) COXCa utilisent d'avantage les acides gras (55%) et moins le glucose (1%) (Figure 18b). Mais, seule la répétition de cette expérience permettra d'en apprécier la significativité.

Pour résumer, les cellules (MC CAF) COXCa semblent être plus oxydatives et plus glycolytiques que les cellules (MC CAF ADI) COXCa. Pour leur respiration mitochondriale, les cellules (MC CAF) COXCa et (MC CAF ADI) COXCa n'utilisent quasiment pas de glucose mais 2.5 fois plus d'acides-gras que les cellules COXCa.

b- Les CAF pré-exposés aux pesticides sécrètent d'avantage de CCL5, chimiokine connue pour favoriser l'invasion tumorale

Afin d'étudier l'impact du milieu conditionné (MC) de CAF pré-exposés aux pesticides sur l'agressivité des cellules tumorales, nous nous sommes intéressés à la teneur en CCL5 de ce MC. En effet, il a été montré que la chimiokine CCL5 était impliquée dans le développement de métastases de nombreux cancers tels que les cancers pancréatiques et mammaires (Singh *et al.*, 2018 ; Karnoub *et al.*, 2007).

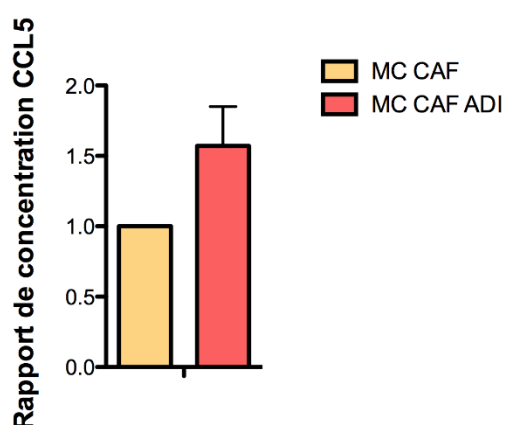


Figure 19 : teneur en CCL5 du MC de CAF pré-exposés aux pesticides par rapport à celle du MC de CAF non exposés

Quantification par Elisa de la sécrétion de CCL5 dans les MC de CAF exposés ou non aux pesticides. La concentration en CCL5 a été rapportée au nombre de cellules correspondant à ce MC. Puis cette teneur a été rapportée à celle du MC CAF (n=3).

D'après la figure 19, les CAF ADI sécrètent 1.5 fois plus de CCL5 que les CAF, bien que statistiquement cette différence ne soit pas significative.

4. Impact direct des pesticides sur les cellules tumorales gliales

Jusqu'à présent nous avons étudié l'effet indirect des pesticides sur les cellules tumorales par l'intermédiaire de leur impact sur les CAF. Cependant dans la réalité, les cellules tumorales gliales sont directement exposées aux pesticides. Afin d'étudier l'impact d'une exposition prolongée aux pesticides sur les cellules tumorales gliales, ces dernières ont été cultivées pendant 21 jours en présence de 2 doses de pesticides : la dose %ADI et la dose 3ADI. La résistance au TMZ a alors été étudiée par un test Prestoblu[®] à J21.

a- Les pesticides ne semblent pas modifier la sensibilité initiale à un traitement unique par témozolomide des cellules tumorales gliales

Nous avons constaté précédemment que la co-culture des cellules tumorales COXCa avec des CAF ayant été pré-exposés aux pesticides les sensibilise au traitement par TMZ (Figure 14). Ici, nous nous sommes intéressés à l'impact direct des pesticides sur la sensibilité au traitement des cellules tumorales gliales. Pour cela, nous avons exposé ces cellules pendant 21 jours aux pesticides. Puis nous les avons exposées à une gamme de TMZ (0, 200 et 400 μ M) pendant 3, 6, 10 et 12 jours. La prolifération des cellules COXCa a alors été appréciée grâce à la réalisation de tests Prestoblu[®].

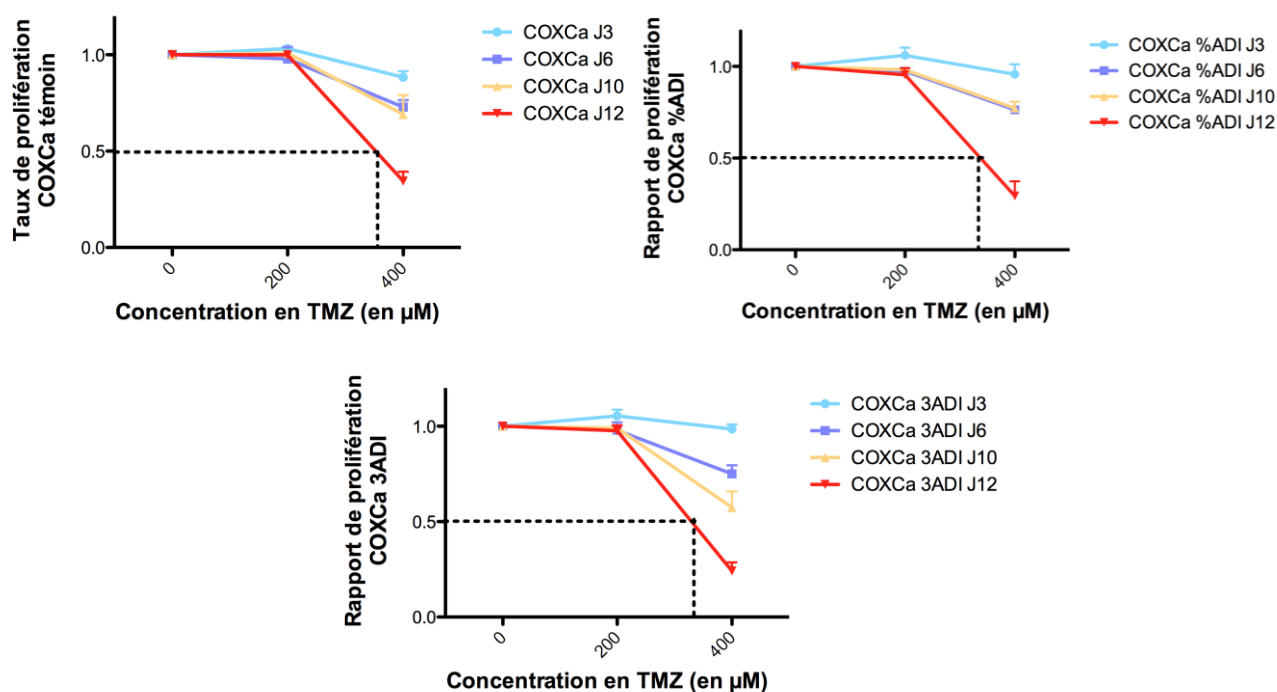


Figure 20 : impact des pesticides sur la sensibilité au traitement par témozolomide des cellules tumorales gliales COXCa

Les cellules tumorales COXCa ont été cultivées pendant 21 jours en présence de 2 doses différentes de pesticides : absence de pesticide, la dose %ADI et la dose 3ADI. Au 21^{ème} jour, les cellules ont été récupérées etensemencées dans des plaques 96 puits. Le lendemain, elles ont été exposées à différentes concentrations de TMZ (0, 200 ou 400 µM) pendant 3, 6, 10 ou 12 jours. La prolifération des cellules tumorales a alors été analysée par un test Prestoblue. (n=1)

Les 3 graphiques de la figure 20 pouvant se superposer, l'exposition directe des cellules tumorales gliales aux pesticides ne semble donc pas modifier leur sensibilité initiale au traitement par TMZ.

C. Discussion

Depuis les années 1970, un lien est établi entre l'utilisation professionnelle des pesticides et la survenue de cancers. Cependant, l'exposition aux pesticides ne se restreint pas à cette population professionnelle. En effet, la population entière y est exposée, notamment via l'eau et l'alimentation puisque 90% des aliments sont contaminés par au moins un pesticide (EFSA, 2017) et 38% sont poly-contaminés (DGCCRF, 2018). Des travaux précédents, réalisés au laboratoire, ont montré qu'un cocktail de 7 pesticides, parmi les plus fréquemment rencontrés ou ayant été parmi les plus fréquemment rencontrés dans l'alimentation européenne (le chlorpyrifos-éthyle, le diméthoate, le

diazinon, l'iprodione, l'imazalil, le maneb et le mancozeb), était capable, à des doses *in vitro* extrapolant les doses nutritionnelles ou les doses journalières acceptables (ADI), d'induire des effets importants et spécifiques sur les cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Hochane et *al.*, 2017) (Leveque et *al.*, 2019). Celles-ci étant des acteurs impliqués dans la niche tumorale, nous avons entrepris d'étudier les effets de cette poly-exposition chronique sur la niche tumorale gliale. Cette niche tumorale comporte de nombreux acteurs dont des cellules dites Cancer Associated Fibroblast (CAF), d'origine hétérogène. Les CAF peuvent être issues des MSC qui, sous l'influence des cellules tumorales, prennent ce phénotype et participent alors au soutien de la tumeur (Barcellos-de-Souza et *al.*, 2016). Pour mener cette étude, nous avons construit deux modèles *in vitro* : un modèle de co-culture CAF pré-exposés aux pesticides-cellules tumorales gliales et un autre modèle exposant les cellules tumorales gliales aux milieux conditionnés (MC) de CAF pré-exposées aux pesticides (Figures 5 et 6). L'utilisation d'un milieu adapté pour les cultures primaires de cellules tumorales, à savoir un milieu sans sérum, a permis de maintenir l'hétérogénéité cellulaire et en particulier, les cellules souches cancéreuses.

Les CAF pré-exposés aux pesticides ont été obtenus à partir de MSC. Ces MSC ont été exposées au mélange de pesticides pendant 21 jours. La dose utilisée pour chaque constituant du mélange était l'extrapolation *in vitro* de la dose ADI, dose qu'un individu moyen de 60 kg peut ingérer quotidiennement tout au long de sa vie sans risque pour sa santé. Afin de reproduire un modèle de culture le plus proche de la réalité et selon les conditions prédéfinies par le laboratoire, à J19, les MSC ont également été exposées pendant 48h à 30% de MC de cellules tumorales gliales COXCa. Ces MSC ont ainsi été différenciées en CAF (Borriello et *al.*, 2017). Cette obtention de CAF se caractérise par l'acquisition du marqueur de surface CD10, marqueur caractéristique de CAF associé à une résistance au traitement et un pronostic de survie sombre dans les cancers du sein et du poumon (Su et *al.*, 2018). En outre, les CAF expriment toujours les marqueurs de surface CD73 et CD105, marqueurs de surface caractéristiques des MSC, leurs cellules d'origine (Borriello et *al.*, 2017). Enfin, le traitement par pesticides n'altèrent pas l'expression des marqueurs de surface des MSC ni des CAF puisqu'au terme des 21 jours de culture, MSC et CAF exposés aux pesticides expriment toujours les marqueurs CD73 et CD105. Ce traitement est également sans effet sur la viabilité des MSC et des CAF. En revanche, en présence de pesticides à la dose ADI, les MSC et les CAF prolifèrent deux fois moins que les MSC et CAF non exposés. Hochane et *al.* expliquent ce ralentissement de prolifération, entre autres, par l'entrée en sénescence de 40% des MSC après 21 jours d'exposition à ce mélange pesticides à la dose ADI (Hochane et *al.*, 2017). Toutefois, les cellules sénescents présentent en théorie un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Gire et *al.*, 1999). Ici, aucune différence n'est retrouvée entre le cycle cellulaire des MSC et CAF et celui des MSC ADI et CAF ADI. Mais cette

expérience ayant été réalisée une seule fois, aucune conclusion ne peut être tirée.

Il a été montré que les CAF favorisaient, par leur présence, une résistance au traitement des cellules tumorales, via notamment la sur-expression de la protéine anti-apoptotique BCL-XL (Singh et *al.*, 2010). Dans le modèle de co-culture que nous avons réalisé, les CAF protègent également les cellules tumorales gliales de l'apoptose puisqu'une sur-expression de la protéine BCL-XL est observée ainsi qu'une diminution de la sensibilité au TMZ. La présence des CAF au contact des cellules de glioblastome induit une diminution de l'expression des marqueurs souches SALL 4 et SOX 2 qui pourrait correspondre à l'entrée en différenciation des CSC. Cette différenciation pourrait permettre la croissance tumorale bien qu'ici il n'est pas été mis en évidence que les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF proliféraient d'avantage que les cellules COXCa témoins (mais cela pourrait être dû à nos conditions de culture : fort taux de confluence rapidement, ce qui nécessite de refaire cette expérience avec des taux d'ensemencement différents). La survenue d'une modification du métabolisme pourrait expliquer l'acquisition de la résistance au traitement TMZ constatée en présence de CAF. En effet, les cellules tumorales co-cultivées avec des CAF présentent un métabolisme différent des cellules COXCa témoins : elles ont un métabolisme global plus important puisqu'elles sont à la fois plus glycolytique et plus oxydative. De plus, il est à noter que les cellules de glioblastome co-cultivées avec les CAF n'utilisent pas les mêmes substrats pour leur respiration mitochondriale que les cellules COXCa témoins. En présence de CAF, les cellules COXCa utilisent d'avantage les acides-gras et la glutamine et moins le glucose pour leur respiration mitochondriale. Or, il a été montré que l'inhibition de l'oxydation mitochondriale de la glutamine stoppait la prolifération des cellules tumorales et les sensibilisait à la mort (Chen, et *al.* 2015). Indirectement, on peut donc penser que plus une cellule utilise la glutamine pour sa respiration mitochondriale, plus elle proliférera et plus elle sera résistante au traitement. Cette surconsommation de la glutamine par les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF et donc à rapprocher de leur résistance au traitement. Le même raisonnement peut être effectué pour les acides gras : plus une cellule a la capacité d'oxyder les acides-gras, plus elle proliférera et sera résistante au traitement. Un métabolisme élevé est notamment caractéristique de cellules à haut caractère prolifératif, même si ici, il n'a pas été mis en évidence que les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF proliféraient d'avantage que les cellules COXCa témoins dans nos conditions de culture (fort taux de confluence rapidement). L'augmentation globale du métabolisme des cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pourrait correspondre à une augmentation de la population de cellules cancéreuses différenciées à partir des CSC. Les pesticides moduleraient cette capacité en favorisant plutôt, au contraire, progressivement l'autorenouveau de la population souche cancéreuse ; ce que semble suggérer le test de clonogénicité.

Pour résumer, les cellules tumorales COXCa co-cultivées avec des CAF, acteur clef du micro-

environnement tumoral, sont plus résistantes au traitement par TMZ. Cette augmentation de la résistance au traitement s'accompagne d'une sur-expression de la protéine BCL-XL, d'une augmentation du métabolisme global, d'une majoration de l'utilisation des acide-gras et de la glutamine pour la respiration mitochondriale au profit du glucose qui est moins utilisé et d'une différenciation des CSC (Figure 21). Lorsque les cellules tumorales COXCa sont co-cultivées avec le même taux de CAF mais ayant été pré-exposés pendant 21 jours aux pesticides, nous ne retrouvons plus ce rôle de soutien et de protection des CAF. En effet, co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides, les cellules tumorales COXCa présentent une sensibilité au traitement proche des cellules COXCa témoins. Cette augmentation de la sensibilité au traitement s'accompagne notamment d'une sur-expression de la protéine pro-apoptique BAX et d'une sous-expression de la protéine anti-apoptotique SURVIVINE. Il y a donc un déséquilibre de la balance survie/apoptose au profit de l'apoptose. De plus, les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides présentent, comparées aux cellules CAF – COXCa une augmentation du taux d'expression des marqueurs SALL 4 et SOX 2, une diminution du métabolisme glycolytique et oxydatif ainsi qu'une diminution de la consommation d'acides-gras et de glutamine pour la respiration mitochondriale (Figure 21). Cette diminution du métabolisme globale des cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides par rapport aux cellules COXCa co-cultivés avec des CAF non exposés est à rapprocher de l'augmentation de l'expression des marqueurs SALL 4 et SOX 2. En effet, cette augmentation d'expression des marqueurs SALL 4 et SOX 2 pourraient signifier que les cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides sont enrichies en CSC. Or les CSC sont des cellules quiescentes ayant donc un métabolisme plus faible. La diminution du métabolisme globale des cellules COXCa co-cultivées avec des CAF pré-exposés aux pesticides pourraient donc être due à un enrichissement en CSC au sein de cette population tumorale. L'impact de l'exposition aux pesticides des cellules stromales de façon chronique pourrait donc présenter un effet délétère (figure 21). En effet, la réexpression des marqueurs de cellules souches et la diminution du métabolisme global dans cette condition de co-culture pourraient signifier le maintien d'un pool plus important de CSC et donc que les cellules résiduelles après traitement (même si la réponse initiale semble plus importante) pourraient être beaucoup plus agressives comme en témoigne le test de clonogénécité. Cet enrichissement en CSC est à rapprocher de l'enrichissement en CCL2, en IL-6 et de l'amplification de la voie COX2/PGE₂ du MC de MSC exposées aux pesticides (Figure 4). En effet, IL-6 est connu pour générer un ME-T inflammatoire favorisant la survie et la croissance des CSC (Wang et *al.*, 2009) (Hossain et *al.*, 2015). De même, l'amplification de la voie COX2/PGE₂ et l'enrichissement en CCL2 favorisent la capacité d'auto-renouveau des CSC au sein des gliomes (Cook et *al.*, 2016) (Tsuyada et *al.*, 2012). Les pesticides favoriseraient donc la mort par apoptose des cellules tumorales, mais ces pesticides pourraient entraîner un tri cellulaire et conduire à l'apparition

d'une population cellulaire extrêmement résistante au traitement. De plus, les pesticides semblent stimuler la sécrétion de CCL5, chimiokine connue pour favoriser l'apparition de métastases dans de nombreux cancers tels que les cancers mammaires et pancréatiques (Karnoub et *al.*, 2007 ; Singh et *al.*, 2018). L'exposition des cellules stromales aux pesticides pourrait donc augmenter l'agressivité des cellules tumorales en favorisant leur invasivité, ce qui reste encore à démontrer. D'autant plus qu'une surexpression des gènes *leptine* et *prolactine*, connus pour favoriser l'invasion tumorale des glioblastomes (Han et *al.*, 2014) (Alkharusi et *al.*, 2016), a été constaté au sein des MSC ADI (Figure 4). Une étude, par système transwell, du potentiel migratoire des cellules tumorales en présence de MC de CAF pré-exposés ou non aux pesticides pourrait permettre de valider cette hypothèse.

Enfin, l'étude de l'effet direct des pesticides sur les cellules tumorales gliales a été débutée. Les pesticides du mélange pouvant traverser la BHE, les cellules tumorales gliales sont donc directement exposées. Il convient donc d'étudier l'effet direct des pesticides sur la prolifération, le caractère souche, la résistance au traitement et le métabolisme des cellules tumorales gliales. Dans un premier temps, nous avons constaté que les pesticides n'avaient pas d'impact direct sur la sensibilité à un traitement unique par témozolomide des cellules tumorales gliales (Figure 20). La modification de la sensibilité des cellules tumorales au traitement par témozolomide se ferait donc par l'intermédiaire de modifications du microenvironnement tumoral. Il reste à vérifier l'impact d'un traitement successif par TMZ, se rapprochant du schéma Stupp, sur une population de COXCa co-cultivées avec des CAF +/- pesticides, pour vérifier l'impact véritable de l'exposition aux pesticides sur la résistance au traitement, tenant compte du test de clonogénicité.

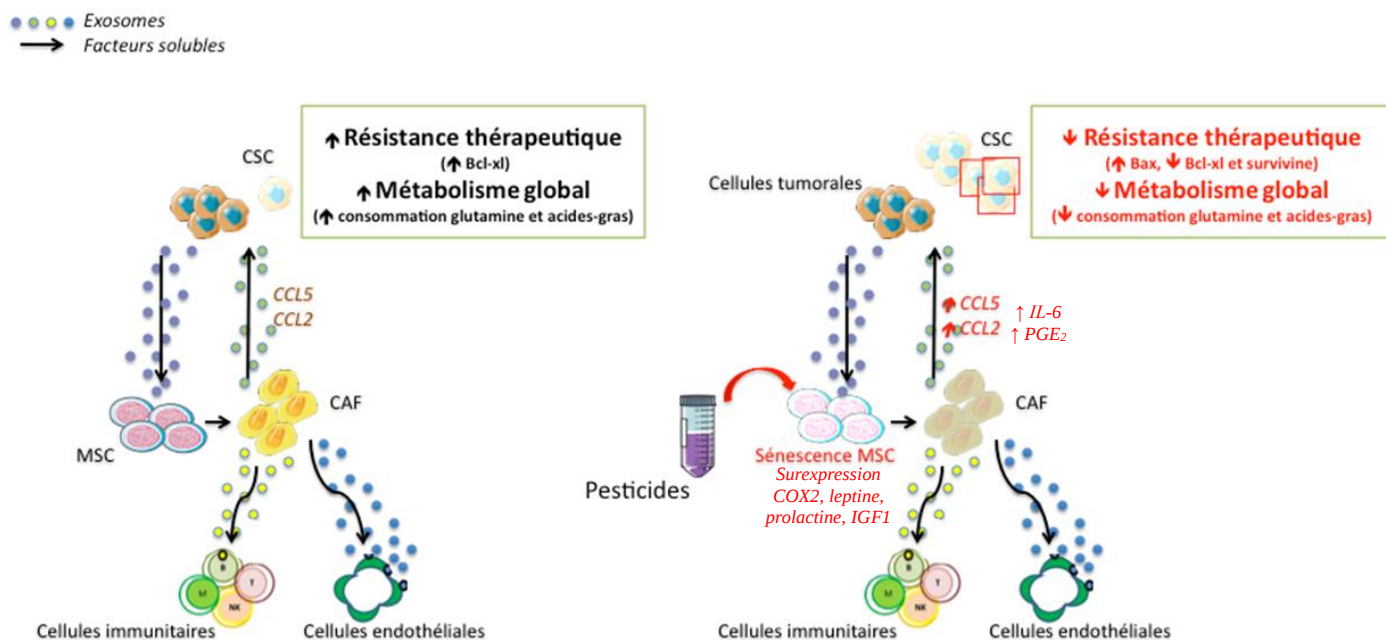


Figure 21 : schéma bilan de l'impact des MSC et des MSC pré-exposées aux pesticides dans le microenvironnement tumoral

III. Etudes cliniques : impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur l'agressivité et la réponse aux traitements

In vitro, l'exposition chronique du microenvironnement tumoral à un mélange de 7 pesticides couramment retrouvés dans l'alimentation semble conduire à l'apparition d'une population tumorale gliale plus agressive et éventuellement plus invasive. Nous nous sommes alors posés la question suivante : cliniquement, des individus exposés aux pesticides de façon chronique, notamment via leur profession, développent-ils des glioblastomes plus agressifs ou répondants moins bien aux traitements ?

A. Matériels et méthodes

1. Format de l'étude, base de données et autorisations

Afin d'étudier l'impact d'une exposition chronique aux pesticides sur l'agressivité et la réponse aux traitements des glioblastomes, une étude rétrospective, multicentrique a été mise en place. Il s'agissait de comparer la réponse au traitement des sujets professionnellement exposés aux pesticides à celle des sujets non exposés. Pour cela, nous avons eu recours à la base de données Clinico-Biologiques de Glioblastomes (BCB-G ou French Glioblastoma Biobank) : base clinico-biologique nationale, mise en place en 2012, regroupant 29 centres et ayant pour coordinateur le Pr Philippe Menei. Elle a été déclarée au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche sous le numéro DC-2011-1467 et l'établissement a obtenu l'autorisation de cession AC-2017-2993. Cette base a pour but de réunir suffisamment de patients en vue de constituer des cohortes représentatives de cette pathologie rare. Pour accéder à cette biobanque, ce projet de thèse a été soumis au comité scientifique de la BCB-G (fiche de soumission - Annexe I) qui a alors donné son accord. A l'heure actuelle, la base collecte les données cliniques et biologiques de 621 patients ayant eu un glioblastome. Tous les patients ont été informés (via une lettre d'information – Annexe II) du recueil de leurs données au sein de cette base et ont signé un consentement écrit (Annexe III). La lettre d'information et le formulaire de recueil de consentement ont été validés par le comité de protection des personnes Ouest II, le 5 novembre 2018, sous le numéro CB-2011-04. La mise en conformité de l'étude vis-à-vis de la CNIL

a été réalisée, la base de données utilisée pour l'étude ayant été déclarée à la CNIL sous le numéro d'enregistrement 1476342-V2. Enfin, cette étude a reçu un avis favorable du groupe éthique clinique, avis 2019 052 (Annexe IV).

2. Population

La population étudiée est la population de la base de données BCB-G, à savoir des patients adultes atteints de glioblastome. Au sein de cette base, 50 patients ont déclarés avoir été professionnellement exposés aux pesticides. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur 50 patients non exposés apparentés aux patients exposés. Cependant, notre étude manquant alors de puissance, nous avons choisi de travailler sur 3 fois plus de patients non exposés et de réaliser une analyse multivariée. Ainsi deux groupes de patients ont été constitués : les patients professionnellement exposés (50 patients) et les patients non exposés (177 patients). Les données nous ont été fournies par la coordinatrice d'étude clinique de la BCB-G sous forme de classeurs Excel. Les mentions renseignées étaient : l'identifiant patient, son sexe, son âge au diagnostic, l'indice de Karnofsky (indice témoignant de l'état clinique général du patient), la date de la chirurgie primitive, le type d'exérèse (complète, subtotale $\geq 90\%$, partielle $< 90\%$ ou simple biopsie), le traitement chimiothérapeutique réalisé en 1^{ère} ligne, la date de survenue de rechutes et la date de décès. Pour les patients exposés professionnellement aux pesticides, le métier exercé et la durée d'exposition étaient précisés.

3. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était la survie globale. Ce critère a été calculé en soustrayant la date de la chirurgie primitive à la date de décès. Les critères de jugement secondaire étaient le délai de survenue de la première rechute et l'âge au diagnostic.

4. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à l'aide de Marc Tassi, interne en Pharmacie au Service d'Information Médicale, Epidémiologie et Economie de la santé (SIMEES) du CHRU de Tours. Une analyse multivariée a été réalisée via le modèle de Cox, modèle permettant d'étudier l'impact de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale et sans rechute tout en prenant en compte d'autres variables pronostiques. Les Hazard Ratios (HR) ajustés, rapport des risques instantanés, ont été estimés ainsi que leur intervalle de confiance à 95 % (IC 95%).

L'hypothèse des risques proportionnels a été vérifiée pour chaque variable par calcul des résidus de Schoenfeld.

En outre, la comparaison des survies globales et sans rechute brutes, c'est-à-dire sans prise en compte des facteurs pouvant impacter ses survies a été réalisée, à titre informatif, via le test du Logrank.

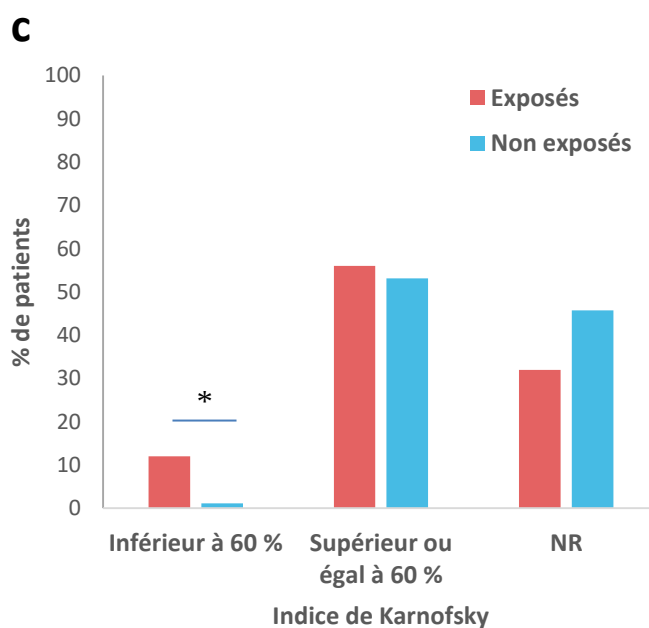
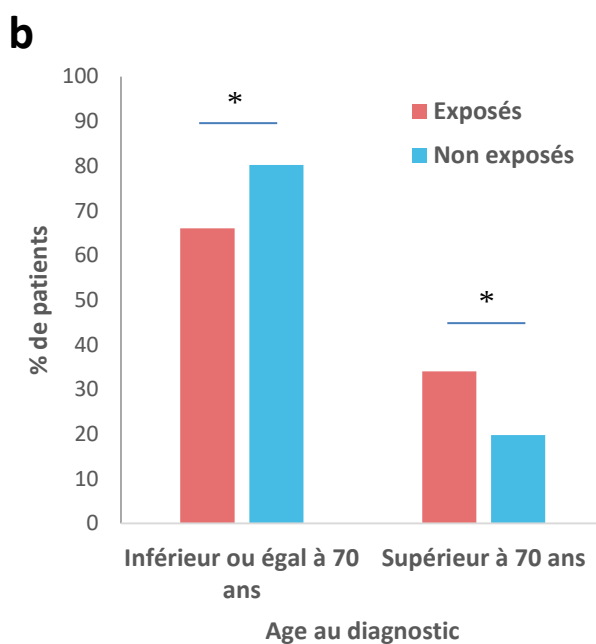
Enfin, l'âge au diagnostic a été comparé grâce à un test de comparaison de moyennes de deux grand échantillons indépendants, le t test, et les différents pourcentages, grâce à un test Z suivant la loi normale.

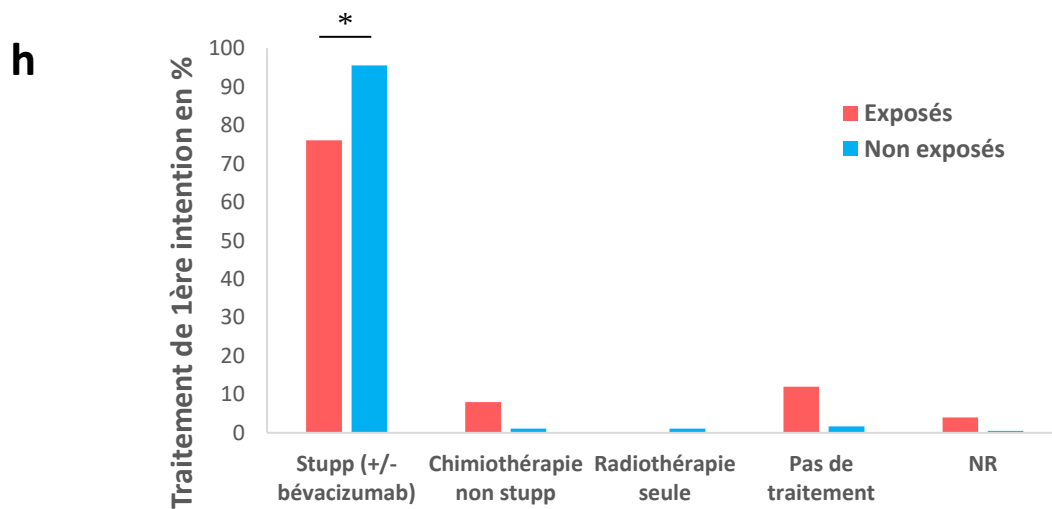
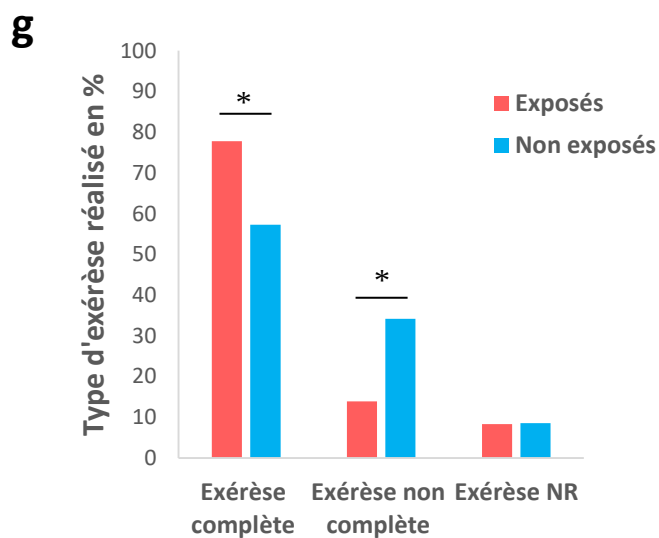
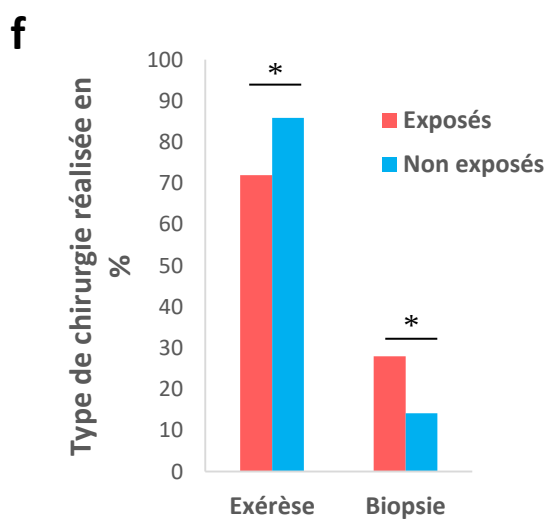
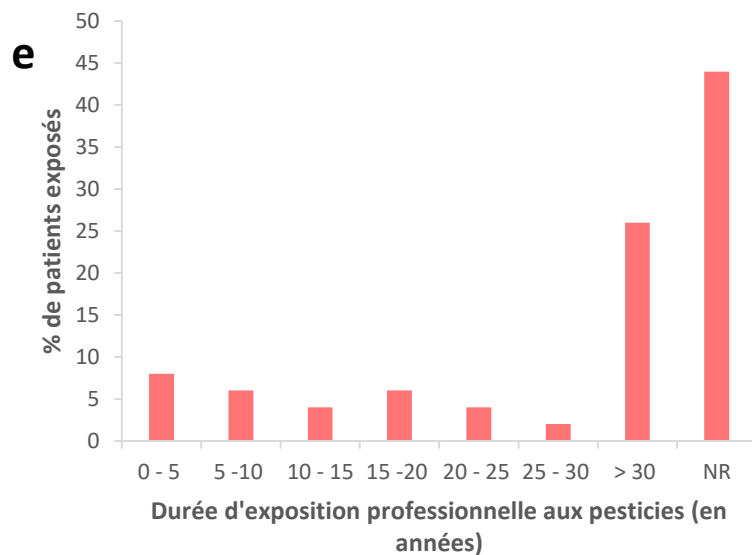
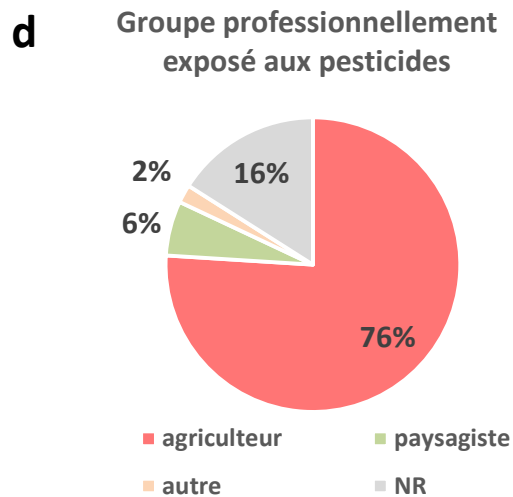
B. Résultats

1. Composition des deux populations étudiées

Afin d'étudier l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur l'agressivité et la réponse au traitement des glioblastomes, deux groupes de patients ont été constitué à partir de la cohorte de la banque BCB-G.

a	Professionnellement exposés aux pesticides	Non professionnellement exposés aux pesticides
Nombre de patients	50	177
Hommes	37 (74 %)	116 (66 %)
Femmes	13 (26 %)	61 (34 %)
Age au diagnostic (ans)	64.20 +/- 10.31	61.35 +/- 9.04
Indice de Karnofsky au diagnostic (%)	85,88 +/- 12.15	90 +/- 0
Antécédents tumoraux	3 (6 %)	14 (8 %)
<i>Cancer du sein</i>	1	4
<i>Tumeur gastrique</i>		2
<i>Cancer de la vessie</i>		2
<i>Cancer de la prostate</i>	1	2
<i>Cancer des testicules</i>		1
<i>Mélanome</i>	1	2
<i>Carcinome basocellulaire</i>		1
Antécédents familiaux de tumeur	6 (12 %)	7 (4 %)
Diagnostic		
<i>GFAP +</i>	50 % (50 % de NR)	71 % (24 % de NR)
<i>Olig 2 +</i>	42 % (56 % de NR)	62 % (34 % de NR)
<i>IDH1 -</i>	70 % (20 % de NR)	80 % (14 % de NR)





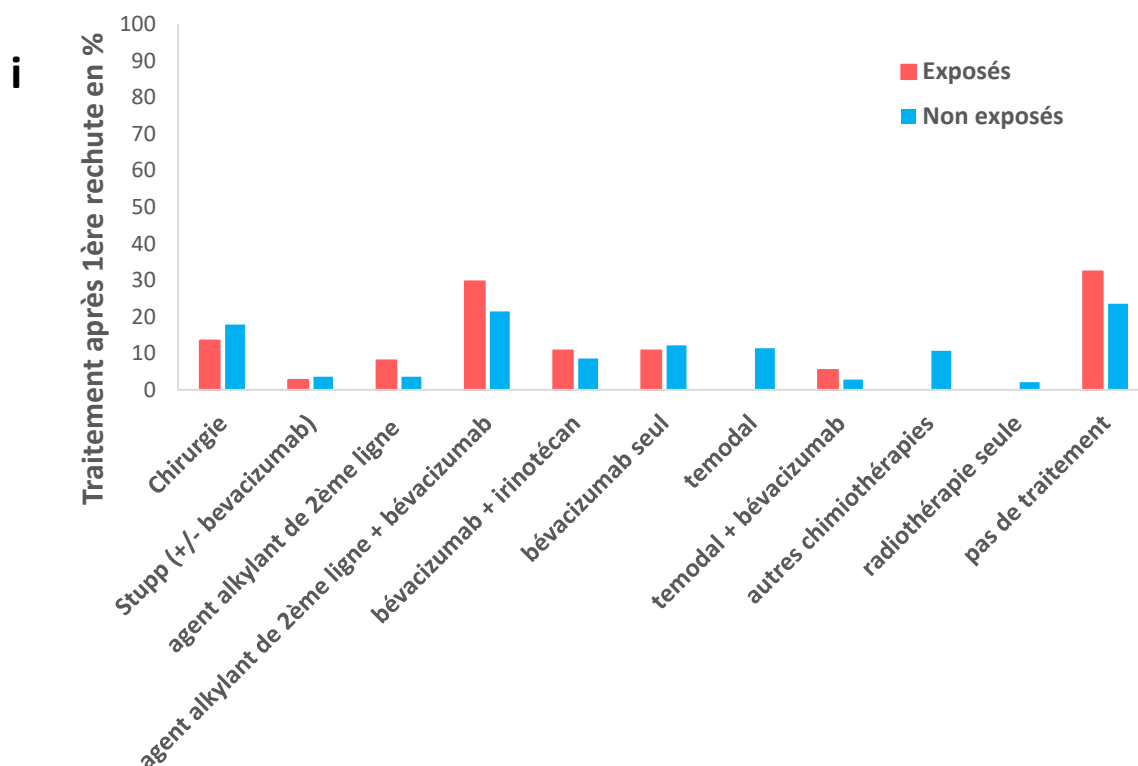


Figure 22 : comparaison des groupes « patients professionnellement exposés aux pesticides » et « patients non exposés aux pesticides »

a- Composition des groupes « Professionnellement exposés aux pesticides » et « Non professionnellement exposés aux pesticides » **b-** Répartition des patients en fonction de l'âge **c-** Répartition des patients en fonction de l'indice de Karnofsky **d-** Professions exercées par les patients professionnellement exposés aux pesticides. **e-** Durées d'exposition professionnelle aux pesticides **f-** Type de chirurgie réalisée en 1^{ère} intention **g-** Type d'exérèse réalisée en 1^{ère} intention **h-** Traitement chimiothérapeutique instauré en 1^{ère} intention (détail Annexe V). **i-** Traitement faisant suite à la première rechute (détail Annexe V) (* différence significative)

Au sein de la cohorte BCB-G, 50 patients ont déclaré avoir été professionnellement exposés aux pesticides. La durée moyenne d'exposition de ces 50 patients était de 23.75 +/- 13.75 ans. 42 % des patients ont été exposés plus de 10 ans mais pour 44 % des patients, la durée d'exposition n'est pas précisée (Figure 22e). Parmi ces patients professionnellement exposés aux pesticides, trois quarts étaient des hommes et étaient agriculteurs (Figures 22a et 22d). L'âge moyen au diagnostic était de 64.20 +/- 10.31 ans. L'indice de Karnofsky au diagnostic, indice témoignant de l'état clinique général du patient, notamment de sa capacité à réaliser différentes tâches de la vie quotidienne, était quant à lui de 85.88 +/- 12.15 %.

Le groupe de patients témoin, patients n'ayant pas déclaré avoir été exposés aux pesticides a été constitué de façon aléatoire. Ce groupe contrôle regroupait 177 patients. L'âge moyen au diagnostic était de 61.35 +/- 9.04 ans et l'indice de Karnofsky de 90 %. 66 % d'entre eux, soit les 2 tiers, étaient des hommes.

Ainsi, tout d'abord, on ne constate pas de différence significative ni au niveau de l'âge, ni au niveau de l'indice de Karnofsky au diagnostic. Toutefois, bien que ces moyennes ne soient pas significativement différentes, on constate que 1.7 fois plus de patients exposés aux pesticides ont plus de 70 ans au diagnostic et que 12 fois plus de patients exposés ont un indice de Karnofsky inférieur à 60 % (Figure 22b). Néanmoins, il est important de nuancer ce dernier résultat : le pourcentage de patients avec un indice de Karnofsky supérieur à 60 % est identique dans les deux groupes et surtout, le pourcentage d'indice de Karnofsky non renseigné est élevé, en particulier dans le groupe « patients non exposés » où il est de 30 % (Figure 22c).

En outre, bien que le groupe « patients exposés » soit constitué de davantage d'hommes par rapport au groupe « patients non exposés », cette différence n'est pas significative.

68 % des patients professionnellement exposés ont subi une exérèse tumorale qui était complète dans 76 % des cas (Figures 22d et 22e). Enfin, 76 % des patients professionnellement exposés ont été traités en 1^{ère} intention par le protocole Stupp, protocole de référence dans le traitement des glioblastomes (Figure 22f).

En revanche, on constate que 86 % des patients non exposés ont subi une exérèse tumorale qui était complète dans 57 % des cas et 95 % des patients non exposés ont été traités en 1^{ère} intention par le protocole Stupp.

On constate donc une différence significative de prise en charge : les patients exposés aux pesticides sont moins pris en charge par une exérèse chirurgicale et moins traités par le protocole Stupp, le protocole de référence.

Concernant le traitement faisant suite à la 1^{ère} rechute, outre l'abstention radio-chimiothérapeutique, dans les deux cas, c'est l'association agent alkylant de 2^{ème} ligne (essentiellement la lomustine)-bévacizumab qui a été majoritairement utilisée (Figure 22g).

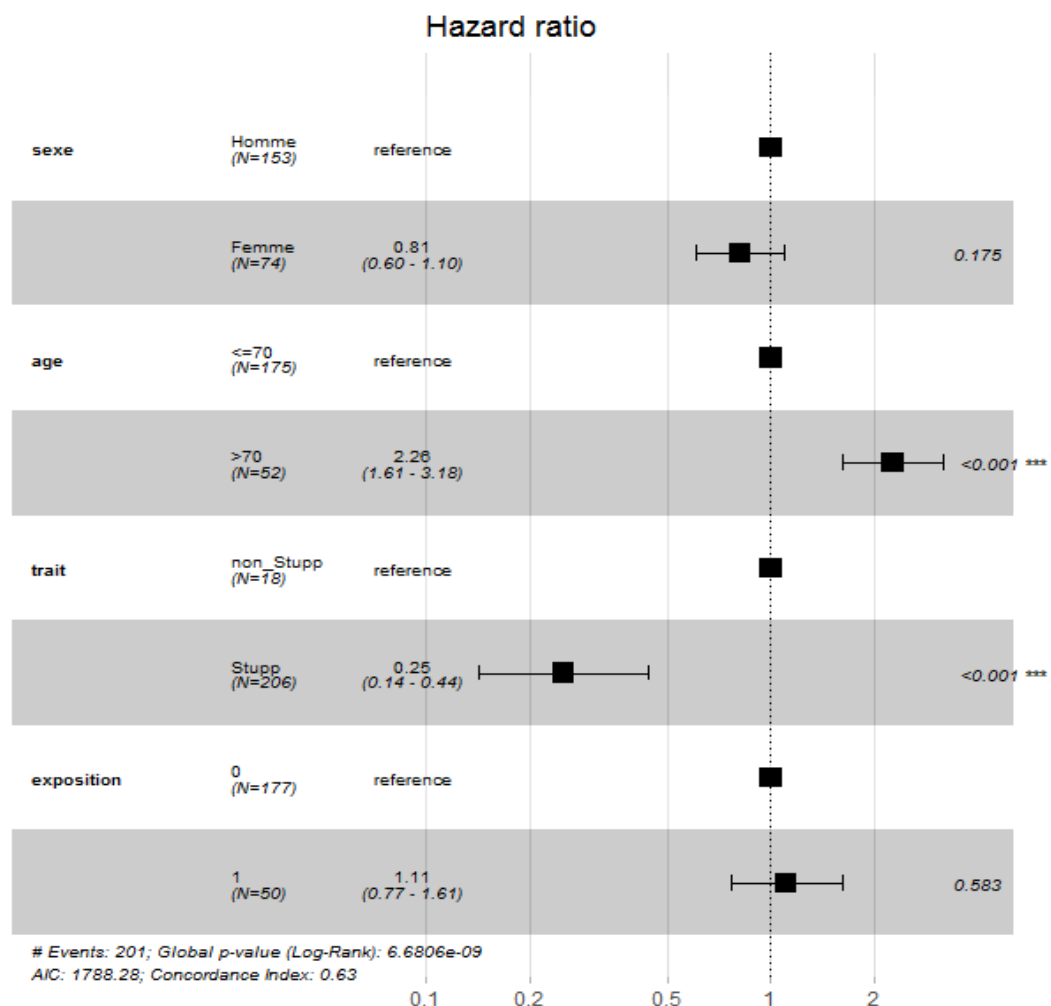
Par ailleurs, les deux groupes ne présentent pas de différence significative au niveau des antécédents tumoraux ni des marqueurs diagnostics. Seuls les antécédents familiaux de tumeurs sont différents : les patients professionnellement exposés aux pesticides ont 3 fois plus d'antécédents familiaux de tumeurs que les patients non exposés (Figure 22a).

2. Analyse de l'impact de l'exposition professionnelle aux pesticides, (du sexe, de l'âge et du traitement) sur la survie globale et la survie sans rechute des patients

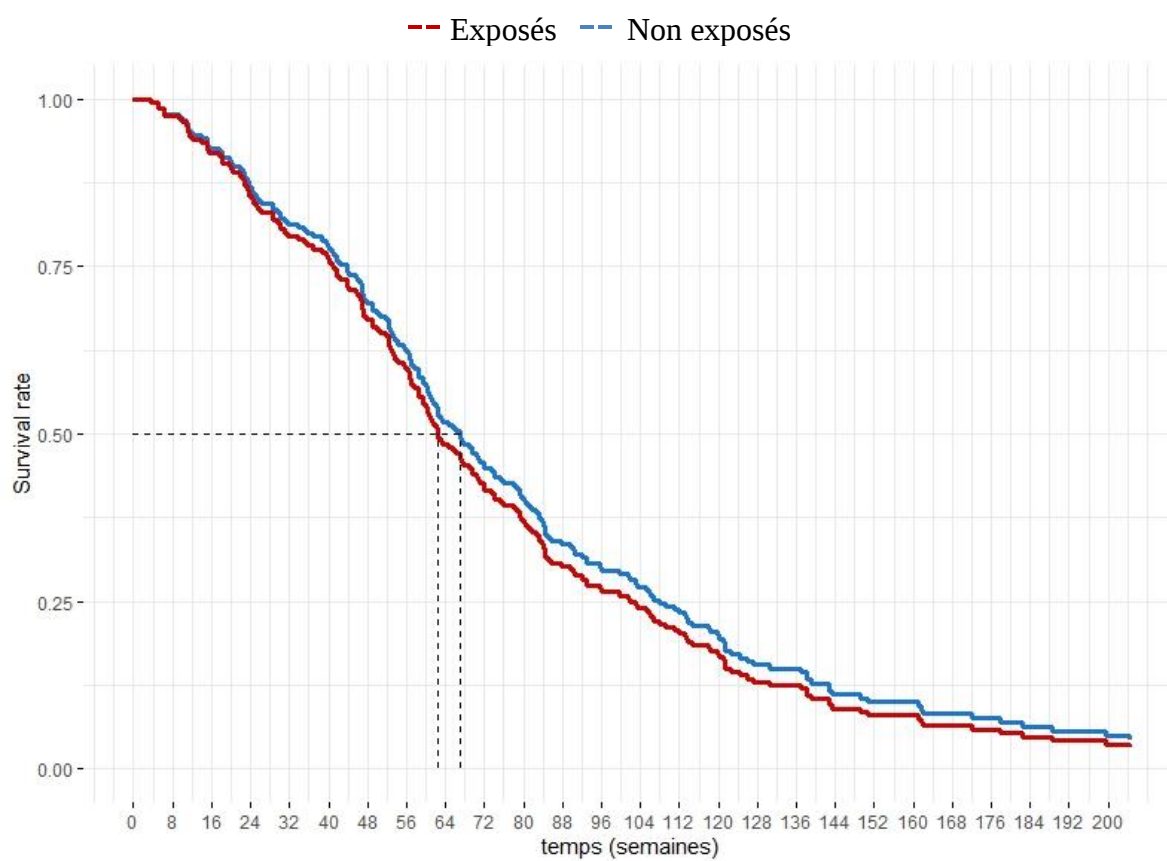
Pour étudier l'impact d'une exposition chronique aux pesticides sur l'agressivité des glioblastomes, nous nous sommes intéressés à la survie globale après diagnostic, ainsi qu'à la survie sans rechute. Pour cela, nous avons réalisé une étude multivariée *via* le modèle de Cox. L'impact de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale et sans rechute a été ajusté sur le sexe, l'âge au diagnostic et le traitement.

En outre, à titre informatif, la comparaison brute des survies globale et sans rechute, c'est-à-dire sans prise en compte des facteurs pouvant impacter ses survies, a également été réalisée via le test du Logrank.

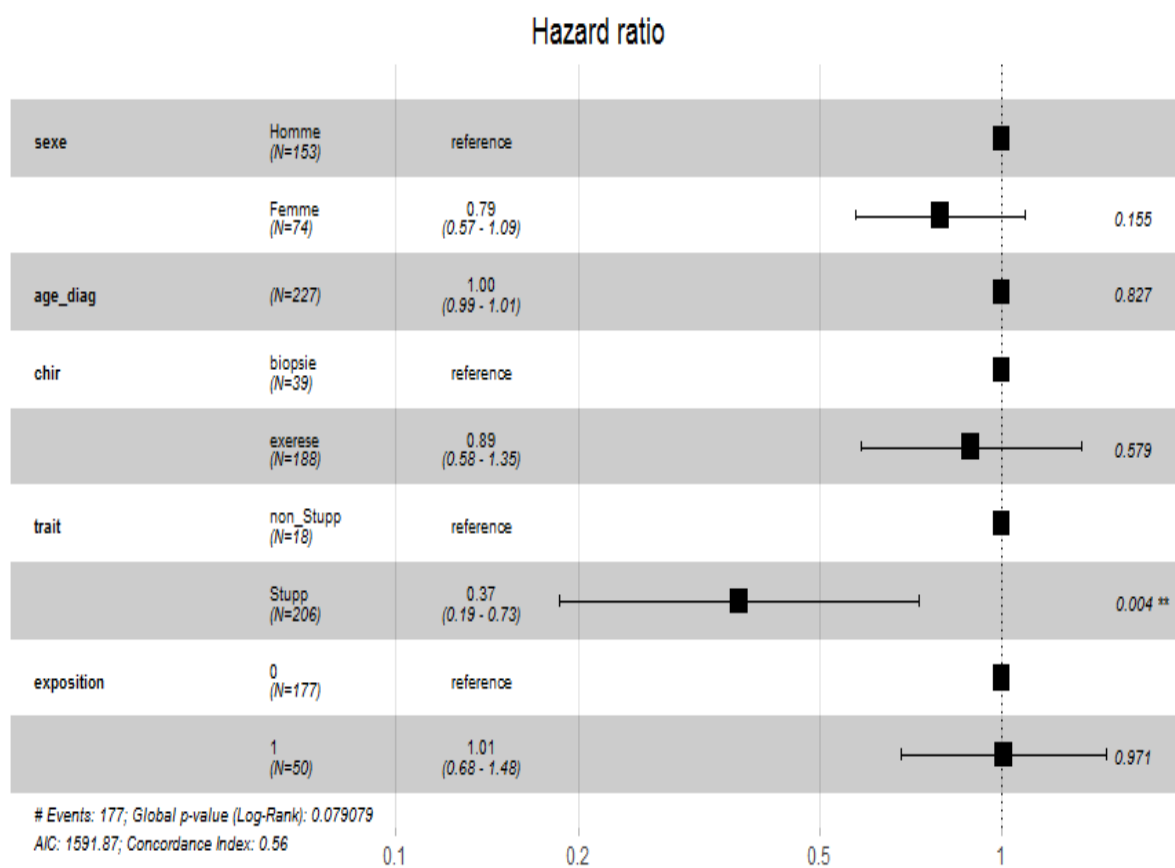
a



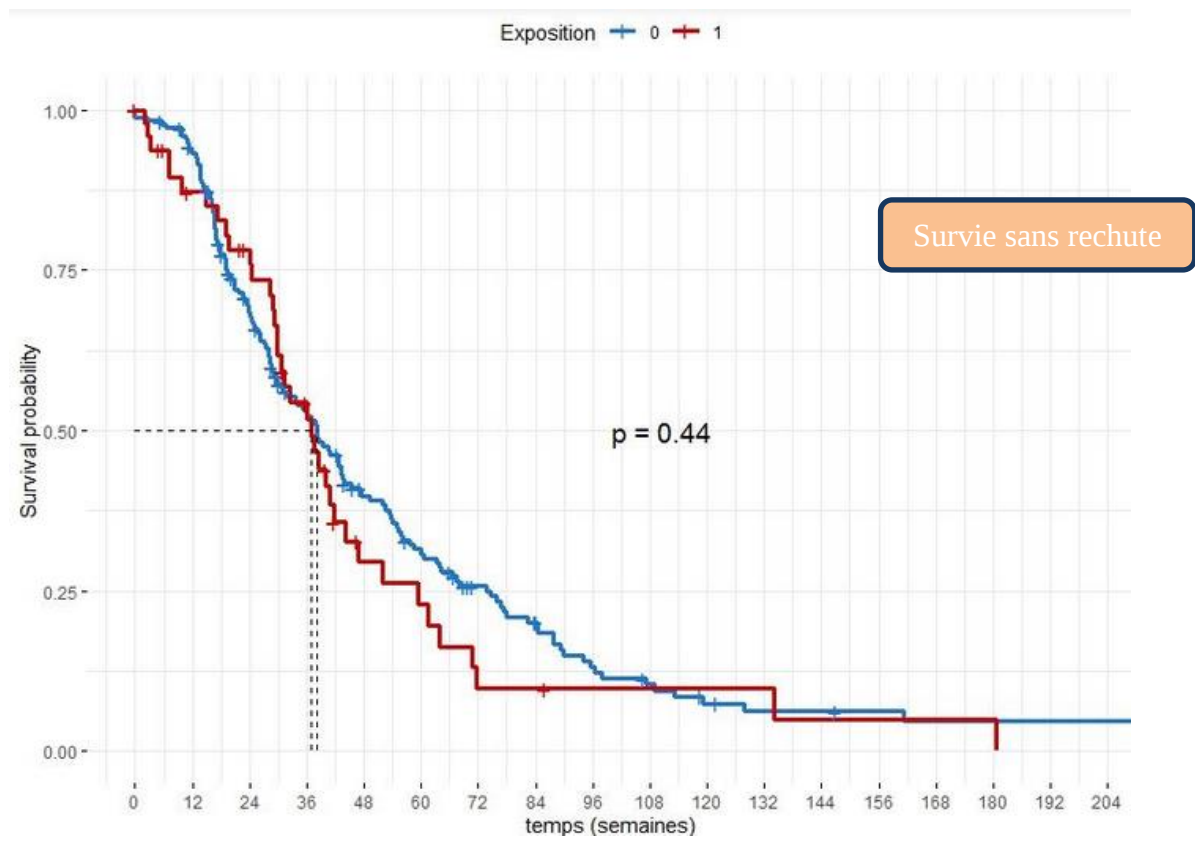
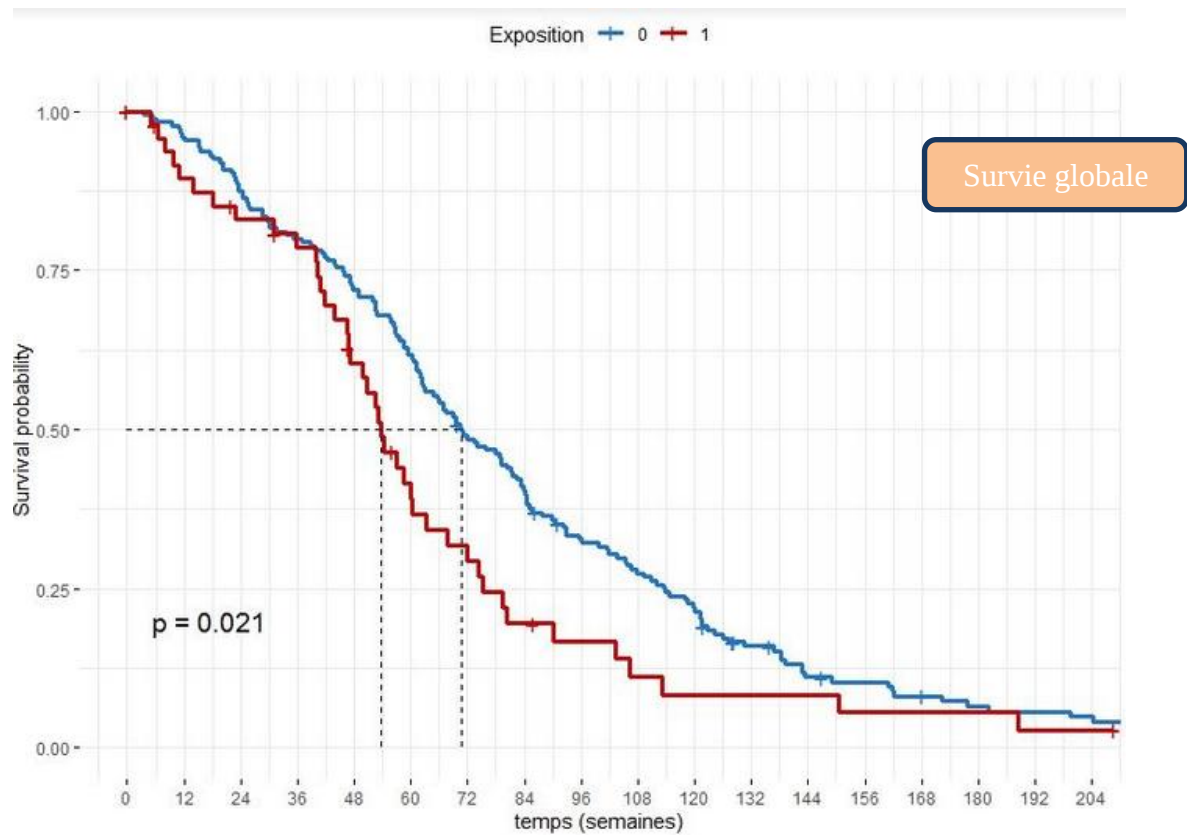
b



c



d



	Professionnellement exposés aux pesticides	Non professionnellement exposés aux pesticides
Médiane de survie globale brute (mois)	12.1	16.0
Médiane de survie sans rechute brut (mois)	8.4	8.9

Figure 23 : impact de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale, la survie sans rechute et l'âge au diagnostic

a- Analyse multivariée réalisée grâce au modèle Cox étudiant l'impact de différents facteurs (sexe, âge, traitement, et exposition professionnelle aux pesticides) sur la survie globale des patients atteints de glioblastome. **b-** Impact de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale. **c-** Analyse multivariée réalisée grâce au modèle Cox étudiant l'impact de différents facteurs (sexe, âge, chirurgie, traitement, et exposition professionnelle aux pesticides) sur la survie sans rechute des patients atteints de glioblastome. **d-** Médiane de survie globale et sans rechute des patients professionnellement exposés aux pesticides, sans prise en compte des autres facteurs impactant le pronostic

Le HR se définit à un temps t comme le rapport entre la fonction de risque instantané au temps t chez une population A (par exemple : les femmes) et la fonction de risque instantané au temps t chez la population contraire B (dans l'exemple proposé : les hommes). Ainsi, un HR supérieur à 1 signifiera que la population A est plus à risque que la population B. Toutefois, cette différence de risque ne sera significative que lorsque l'intervalle de confiance à 95 % ne comprend pas le chiffre 1.

Ainsi, selon la Figure 23a, seuls l'âge au diagnostic (HR = 2.26, IC à 95% = 1.61 – 3.18, $p < 0.001$) et le traitement thérapeutique reçu, à savoir le traitement Stupp (HR = 0.25, IC à 95% = 0.14 – 0.44, $p < 0.001$), semblent impacter la survie globale des patients atteints de glioblastome. Logiquement, un âge au diagnostic supérieur à 70 ans est associé à une diminution significative de la survie globale (HR >1) tandis qu'un traitement par le protocole Stupp, protocole de référence, est un facteur protecteur (HR <1).

Etre une femme semble être un facteur protecteur puisque HR = 0.81 < 1 même si la significativité statistique ne ressort pas ici (IC à 95 % = 0.60 – 1.10 et $p = 0.175$).

Enfin, concernant l'exposition aux pesticides, on constate que le hazard ratio est supérieur à 1 (HR = 1.11) mais la différence est non significative sur cet effectif (IC à 95% = 0.77 – 1.61 et $p = 0.583$). La courbe de survie des patients professionnellement exposés ou non aux pesticides ne montre également pas de différences statistiques.

Concernant, la survie sans évolution (Figure 23c), une nouvelle fois être une femme semble être un facteur protecteur (HR = 0.79), mais de nouveau ceci n'est pas significatif (IC à 95 % = 0.57 – 1.09 et $p = 0.155$). Quant à l'exposition professionnelle aux pesticides, selon ce modèle, elle n'impacte en rien le délai de survenue de rechute. En effet, selon ce modèle il n'y a aucune différence entre les

patients exposés et non exposés (HR = 1.01, IC à 95 % = 0.68 – 1.48). Selon cette analyse, seule la prise en charge initiale par le protocole chimio-radiothérapeutique Stupp apparaît comme permettant de retarder la survenue d'une rechute.

Enfin, si on s'intéresse uniquement aux valeurs brutes, c'est-à-dire en comparant uniquement la médiane de la survie globale et de la survie sans rechute des deux groupes « patients exposés » et « patients non exposés » sans tenir compte des autres facteurs, on constate que la survie globale des patients exposés est de seulement 12.1 mois alors qu'elle est de 16 mois pour les patients non exposés (différence significative $p = 0.021$). En revanche, la survie sans rechute n'est pas modifiée : 8.4 mois pour les patients exposés contre 8.9 mois pour les patients non exposés (Figure 23d).

C. Discussion

In vitro, au cours d'une précédente étude réalisée au sein de l'équipe « Apoptose et Progression tumorale » du CRCINA, nous avons constaté que l'exposition chronique du micro-environnement tumoral à un mélange de 7 pesticides pourrait augmenter l'agressivité des cellules tumorales gliales notamment en entraînant un enrichissement en CSC caractérisé par une augmentation des facteurs de transcription impliqués dans la maintenance des CSC, à savoir les facteurs SALL 4, NANOG et SOX 2 mais aussi un enrichissement du MC en CCL2 et PGE₂, chimiokines favorisant l'auto-renouvellement des CSC ainsi qu'en IL-6, connue pour favoriser la survie et la croissance des CSC. De plus cette exposition aux pesticides favoriserait l'invasivité des cellules tumorales gliales, même si cela reste à prouver, par stimulation de la sécrétion de la chimiokine CCL5, de leptine et de prolactine par les cellules stromales (Figures 4 et 21). En outre, il a été montré qu'une exposition professionnelle aux pesticides pourrait être un facteur de mauvais pronostic du lymphome B diffus à grandes cellules notamment en terme de réponse au traitement, de survie globale et de survie sans rechute (Lamure et *al.*, 2017). Bien que le lymphome B soit une pathologie de meilleure pronostic que le glioblastome avec une survie à 5 ans de 53 % (Monnereau et *al.*, 2013) (permettant ainsi probablement d'observer plus facilement l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides), nous nous sommes demandés si une exposition aux pesticides, plus précisément si une exposition professionnelle aux pesticides pourrait être responsable de la survenue de glioblastomes plus agressifs, répondant encore moins aux traitements, le glioblastome étant de base connu pour échapper au traitement, la moyenne de survie étant de 15 mois une fois le diagnostic établi (Ostrom et *al.*, 2015). Il s'agissait ainsi de réaliser une étude rétrospective et de comparer la survie globale des patients exposés professionnellement aux pesticides à ceux n'ayant pas été exposés. La survie sans

rechute et l'âge au diagnostic étaient les critères de jugement secondaires.

Le glioblastome étant une pathologie rare, l'incidence étant de 3 cas pour 100 000 habitants en France, nous avons eu recours à une base de données multicentrique, la BCB-G, afin de recueillir un nombre suffisant de patients. La BCB-G collecte les données de 29 centres, à l'heure actuelle 621 patients atteints d'un glioblastome ont donné leur consentement pour que leurs données cliniques et biologiques soient recueillies au sein de cette base. Sur ces 621 patients, 50 ont déclarés avoir eu une exposition professionnelle aux pesticides. Deux groupes ont alors été constitués : les patients atteints de glioblastome et professionnellement exposés aux pesticides et les patients atteints de glioblastome mais non exposés aux pesticides. Pour augmenter la puissance du test, nous avons choisi de sélectionner aléatoirement un nombre conséquent de patients non exposés, à savoir approximativement 3 fois plus de patients que les exposés soit 177 patients. La prise en compte des facteurs impactant la survie des patients, tels que l'âge au diagnostic et le traitement réalisé se ferait alors au moment de l'analyse grâce à l'utilisation du modèle de Cox (Fontaine et *al.*, 2010).

Tout d'abord, épidémiologiquement, on constate qu'au sein de la banque BCB-G, 50 patients ont déclarés avoir été professionnellement exposés aux pesticides. La banque recueillant les données de 621 patients, 7 % des patients de cette base ont donc été professionnellement exposés aux pesticides. En France, 5.6 millions d'habitants bénéficient d'une prestation servie par le régime agricole (MSA, 2019). En 2019, la France compte 64.8 millions d'habitants (Ined, 2019). Ainsi, en 2019, 8 % des français bénéficie d'une prestation servie par le régime agricole et donc par extrapolation, environ 8 % des français sont susceptibles d'être exposés professionnellement aux pesticides. Ainsi, la banque BCB-G semble refléter la population générale d'un point de vue exposition professionnelle aux pesticides. Autrement dit, au sein de la banque BCB-G, il ne semble pas y voir plus de patients exposés professionnellement aux pesticides qu'au sein de la population générale.

L'âge moyen de survenue d'un glioblastome dans la population générale est de 61,9 ans (Zouaoui et *al.*, 2012). De même, il est de 61.35 ans pour les patients de la base BCB-G n'ayant pas déclaré avoir été exposés aux pesticides et de 64.20 ans pour les patients y ayant été exposés professionnellement. Bien que chez les patients professionnellement exposés, la survenue d'un glioblastome semble être plus tardive, il n'existe pas de différence significative. Toutefois, il est important de préciser ici que bien que cet âge au diagnostic moyen ne soit pas différent, on constate que 1.7 fois plus de patients exposés aux pesticides ont, au diagnostic, plus de 70 ans, âge limite pour la prise en charge par exérèse chirurgicale suivie d'un protocole Stupp. De même, bien qu'on ne constate pas de différence significative concernant l'indice de Karnofsky moyen au diagnostic, il est important de préciser que 12 fois plus de patients exposés aux pesticides ont un indice de Karnofsky inférieur à 60 % au diagnostic, indice de Karnofsky requis pour la réalisation d'une exérèse chirurgicale et une prise en

charge par le protocole Stupp. Toutefois, apparaît ici une des limites de la base BCB-G puisque l'indice de Karnofsky n'est pas renseigné pour 18 % des patients exposés et pour 30 % des patients non exposés, rendant ainsi la conclusion difficile. En outre, on constate une modification du rapport homme/femme. En effet, en théorie cette tumeur touche 1.5 à 1.8 hommes pour 1 femme (Baldi et al., 2010), *ratio* retrouvé au sein de notre population témoin puisque notre groupe « Patients non exposés » est constitué de 66 % d'hommes à savoir 1.9 hommes pour 1 femme. Pour le groupe « Patients exposés », ce sont bien les hommes qui sont d'avantage touchés par le glioblastome mais ce taux est plus important puisque 2.8 hommes sont touchés pour 1 seule femme. Cette différence, non significative, s'explique par le fait que les professions exposés aux pesticides, à savoir essentiellement les métiers de l'agriculture, sont essentiellement exercées par des hommes. En effet, en 2016, seulement 25.6 % des chefs d'exploitation et 35.1 % des salariés agricoles étaient des femmes (MSA, 2018). Ainsi d'un point de vue épidémiologique, notre groupe témoin semble être représentatif de la population générale : âge moyen de 61.35 ans au diagnostic et sexe ratio de 1.9 hommes pour 1 femme. En revanche, nous constatons que la population exposée aux pesticides est légèrement différente : âge au diagnostic légèrement plus tardif et sexe ratio de 2.8 hommes pour 1 femme. Or bien que cela ne soit pas significatif, le fait d'être une femme semble être un facteur protecteur en terme de survie globale (HR = 0.81, IC à 95 % = 0.60 - 1.10 et p = 0.175) et de survie sans rechute (HR = 0.79, IC à 95 % = 0.57 – 1.09 et p = 0.155) (Figure 23a et c).

Enfin et surtout, on constate une prise en charge initiale significativement différente puisque seulement 72 % des patients exposés aux pesticides subissent une exérèse chirurgicale contre 85 % des non exposés et seulement 76 % des patients exposés sont traités initialement par le protocole Stupp, protocole de référence, contre 95 % des non exposés. Le standard thérapeutique, à savoir exérèse optimale suivie du protocole Stupp s'applique pour les patients de 18 à 70 ans avec un indice de Karnofsky supérieure à 60 % (Ma et al., 2010). Or, nous avons constaté une différence significative quant-à la proportion de patients de plus de 70 ans et ayant un indice de Karnofsky inférieure à 60 %. Ainsi, cette prise en charge différente, à pondérer toutefois par la qualité de l'exérèse, l'exérèse des patients exposés étant complète dans 78 % des cas alors qu'elle n'est complète que dans 57 % des cas pour les patients non exposés, pourrait, entre autre s'expliquer par une différence d'âge et d'indice de Karnofsky au diagnostic. En outre, cette différence de prise en charge s'accompagne d'une diminution de la survie globale des patients exposés aux pesticides. Outre l'âge et l'état général du patient au diagnostic, la localisation de la lésion est le 3^{ème} élément clef conditionnant la réalisation d'une exérèse. Ainsi, les patients professionnellement exposés aux pesticides pourraient éventuellement présenter des tumeurs dont la localisation ou l'invasivité rendent difficile la réalisation d'une exérèse.

Toutefois, si on s'intéresse à l'impact proprement parlé de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale et la survie sans rechute, c'est-à-dire si on normalise les résultats en tenant compte du sexe, de l'âge au diagnostic et du traitement réalisé, on constate alors que l'exposition professionnelle aux pesticides ne semble pas modifier le pronostic (Figure 23b). De même, dans ces conditions, le délai de survenue de rechute ne varie pas, que le patient ait été exposé ou non aux pesticides (Figure 23c). Toutefois, il pourrait être intéressant de répéter cette analyse en s'intéressant également à la durée de l'exposition professionnelle des patients. En effet, on sait que des durées d'exposition supérieure à 10 ans constituent un facteur péjoratif. Par exemple, la maladie de Parkinson et les lymphomes malins non hodgkinien sont reconnus comme étant des maladies professionnelles lors d'une exposition professionnelle aux pesticides supérieure à 10 ans (INRS, 2012 et INRS, 2015). Ainsi, nous pouvons nous demander si l'on obtiendrait les mêmes courbes de survie pour des patients exposés plus ou moins de 10 ans aux pesticides (le groupe « Patients exposés » étant constitué de 14 % de patients ayant été exposés moins de 10 ans aux pesticides, de 42 % de patients ayant été exposés plus de 10 ans aux pesticides et de 44 % de patients pour lesquels la durée d'exposition n'est pas renseignée (Figure 22e)).

Pour résumer, les groupes « Patients exposés » et « Patients non exposés » constituent deux populations différentes, différentes notamment vis-à-vis de l'âge, de l'indice de Karnofsky au diagnostic ainsi que de la prise en charge thérapeutique : le groupe « Patients exposés » est constitué de d'avantage de patients de plus de 70 ans, de d'avantage de patients ayant un indice de Karnofsky inférieur à 60 %, subit moins d'exérèse chirurgicale et la prise en charge par le protocole Stupp est moins fréquente. Cette différence de prise en charge thérapeutique, qui s'accompagne d'une diminution de la survie globale de 4 mois dans le groupe patients exposés, s'explique probablement par un âge significativement plus élevé au diagnostic ainsi qu'un indice de Karnofsky plus péjoratif. Toutefois, cette prise en charge différente pourrait également être le reflet d'une tumeur plus sévère, plus invasive. Il apparaît donc intéressant de comparer la localisation tumorale des patients exposés aux pesticides à celle des patients non exposés.

Enfin, via cette analyse multivariée, pour deux patients identiques, c'est-à-dire ayant le même âge, le même sexe et la même prise en charge thérapeutique, nous n'avons pas pu montrer que l'exposition professionnelle aux pesticides impactait directement la survie globale et la survie sans rechute des patients atteints de glioblastome. Il est important, toutefois, de préciser ici que notre étude est limitée par le nombre restreint de patients exposés aux pesticides et comporte un biais de sélection important : nous n'avons pas d'information sur la situation géographique des patients. Ainsi, il est probable que le groupe « Patients exposés », à savoir groupe constitué essentiellement d'agriculteurs, soient constitués de patients vivants à la campagne alors que le groupe « Patients non exposés » contiennent

d'avantage d'individus citadins, individus exposés à d'autres pollutions pouvant, elles-aussi, impacter le pronostic des glioblastomes ; à cela, il faut ajouter l'exposition non professionnelle aux pesticides de l'ensemble de la population notamment via l'alimentation ou encore la pollution atmosphérique pour les individus résidant à proximité des zones d'épandages. Il est également important de préciser que cette étude a été réalisée sur un nombre limité de patients, nombre limité par la rareté de cette tumeur.

Ainsi, afin d'étudier proprement l'impact des pesticides sur la réponse au traitement des glioblastomes et de limiter certain biais de sélection, il serait intéressant de connaître l'exposition réelle aux pesticides des différents individus. Pour connaître cette exposition réelle, le dosage des pesticides dans les cheveux, matrice conservée pour chaque patient de la base BCB-G, paraît particulièrement intéressant. En effet, il est probable que via cette technique de mesure de l'exposition, certain patient n'ayant pas déclaré avoir été exposé aux pesticides le soit en réalité. Les principales limites d'une telle étude restent toutefois son coût et la longueur des cheveux recueillis.

IV. Conclusion générale

Au cours de ces travaux, nous avons tout d'abord montré qu'*in vitro*, l'exposition chronique des cellules stromales à un mélange de 7 pesticides couramment retrouvé, ou ayant été couramment retrouvés, dans l'alimentation des européens pourrait engendrer la survenue d'une tumeur gliale plus agressive. En effet, cette exposition pourrait entraîner un enrichissement en cellules souches cancéreuses comme en témoigne la surexpression des marqueurs SALL 4, NANOG et SOX 2, facteurs de transcription impliqués dans la maintenance des CSC, mais aussi l'enrichissement du sécrétome des MSC exposées aux pesticides en PGE₂, CCL2, impliqués dans l'autorenouveau des CSC, et en IL-6, connue pour favoriser la survie et la croissance des CSC. Cette exposition à ce mélange de 7 pesticides entraîne également un enrichissement du sécrétome des MSC en CCL5 et une surexpression des gènes *leptine* et *prolactine*, connus pour favoriser l'infiltration tumorale.

Lors d'une étude clinique rétrospective, nationale, multicentrique, réalisée sur 227 patients (50 patients professionnellement exposés aux pesticides et 177 non exposés), nous avons constaté une diminution de la survie globale des patients professionnellement exposés aux pesticides : la survie globale des patients professionnellement exposés aux pesticides est de 12.1 mois alors qu'elle est de 16 mois pour les non exposés. Lors de l'analyse multivariée, réalisée grâce au modèle de Cox, c'est-à-dire en normalisant les patients suivant leur âge, leur sexe et leur prise en charge thérapeutique, nous n'avons pas montré d'impact direct de l'exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale et la survie sans rechute.

Toutefois, nous avons constaté une différence de prise en charge significative entre ces deux groupes de patients : les patients professionnellement exposés aux pesticides sont moins pris en charge par exérèse et bénéficient moins du traitement par le protocole Stupp, le protocole de référence. Dès lors, il s'agit de comprendre cette différence de prise en charge, cette différence est probablement due au fait que 1.7 fois plus des patients exposés aux pesticides ont plus de 70 ans. Mais cette différence de prise en charge pourrait également être due à une localisation tumorale différente, à un caractère plus invasif des glioblastomes survenant chez les individus professionnellement exposés aux pesticides. Une nouvelle analyse tenant compte de la localisation tumorale semble donc être nécessaire.

Pour conclure, une poursuite de l'analyse avec prise en compte de la durée d'exposition professionnelle aux pesticides, de la localisation tumorale, une extension de l'effectif, semble être le seul moyen de trancher sur l'impact de l'exposition aux pesticides sur la survie globale des patients atteints de glioblastome.

Bibliographie

- Abels, ER., Breakefield, XO. (2016). Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell Mol Neurobiol* 36, 301-312.
- AFSSET. (2010). Rapport Exposition de la population générale aux résidus de pesticides. 1-354
- Alkharusi, A., Yu, S., Landázuri, N., Zadjali, F., Davodi, B., Nyström, T., Gräslund, T., Rahbar, A., Norstedt, G. (2016). Stimulation of prolactin receptor induces STAT-5 phosphorylation and cellular invasion in glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 29, 79572-79583.
- Allen, NJ., Barres, BA. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457, 675–677.
- ANOCEF. (2018). Référentiel glioblastome (grade IV OMS). 1-66.
- Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., Loiseau, H. (2010). Epidemiology of glioblastoma. *Neurochirurgie* 56, 433-440.
- Barcellos-de-Souza, P., Comito, G., Pons-Segura, C., Taddei, ML., Gori, V., Becherucci, V., Bambi, F., Margheri, F., Laurenzana, A., Del Rosso, M., Chiarugi, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells are Recruited and Activated into Carcinoma-Associated Fibroblasts by Prostate Cancer Microenvironment-Derived TGF- β 1. *Stem Cells* 34, 2536-2547.
- Bell, EH., Zhang, P., Fisher, BJ., Macdonald, DR., McElroy, JP., Lesser, GJ., Fleming, J., Chakraborty, AR., Liu, Z., Becker, AP., Fabian, D., Aldape, KD., Ashby, LS., Werner-Wasik, M., Walker, EM., Bahary, JP., Kwok, Y., Yu, HM., Laack, NN., Schultz, CJ., Gray, HJ., Robins, HI., Mehta, MP., Chakravarti, A. (2018). Association of MGMT Promoter Methylation Status With Survival Outcomes in Patients With High-Risk Glioma Treated With Radiotherapy and Temozolomide: An Analysis From the NRG Oncology/RTOG 0424 Trial. *Jama oncology* 4, 1405-1409.
- Béranger, R., Hardy, EM., Dexet, C., Guldner, L., Zaros, C., Nougadère, A., Metten, MA., Chevrier, C., Appenzeller, BMR. (2018). Multiple pesticide analysis in hair samples of pregnant French women: Results from the ELFE national birth cohort. *Environment International* 120, 42-53.
- Birnbaum, T., Roider, J., Schankin, C., Padovan, C., Schichor, C., Goldbrunner, R., Straube, A. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *Journal of Neuro-Oncology* 83, 241-247.
- Bonnefoy, N. (2012). Rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement. *Sénat* 42, 1-348.
- Borriello, L., Nakata, R., Sheard, MA., Fernandez, E., Sposto, R., Malvar, J., Blavier L., Shimada, H., Asgharzadeh, S., Seeger, RC., DeClerck, YA. (2017). Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. *Cancer Research* 77, 5142-5157.

- Brem, H., Ewend, MG., Piantadosi, S., Greenhoot, J., Burger, PC., Sisti, M. (1995). The safety of interstitial chemotherapy with BCNU-loaded polymer followed by radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant gliomas: phase I trial. *Journal of neuro-oncology* 26, 23.
- Carpentier, A. (2008). Surgical resection of gliomas in 2008. *Cancer/radiothérapie* 12, 676-686.
- Carson, R. (1962). *Primitifs silencieux*.
- Catalano, V., Gaggianesi, M., Spina, V., Iovino, F., Dieli, F., Stassi, G., Todaro, M. (2011). Colorectal Cancer Stem Cells and Cell Death. *Cancers* 3, 1929-1946.
- Chen, L., Cui, H. (2015). Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *International Journal Of Molecular Sciences* 16, 22830-22855.
- Cook, PJ., Thomas, R., Kingsley, PJ., Shimizu, F., Montrose, DC., Marnett, LJ., Tabar, VS., Dannenberg, AJ., Benezra, R. (2016). Cox-2-derived PGE2 induces Id1-dependent radiation resistance and self-renewal in experimental glioblastoma. *Neuro Oncology* 18, 1379-1389.
- DGCCRF. (2018). Contrôle des résidus de pesticides dans les denrées végétales en 2016.
- Dick, E., (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- EFSA. (2010). 2008 Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal* 2010
- EFSA. (2013). The 2010 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2013
- EFSA. (2017). Annual Report 2016 of the European Food Safety Authority.
- European Commission. (2016). EU Pesticides database-Active substances. [Ec.europa.eu](http://ec.europa.eu).
- Expertise collective Inserm. (2013). Pesticides Effets sur la santé. 1-146.
- Fontaine, D., Paquis, P. (2010). Glioblastoma: Clinical, radiological and biological prognostic factors. *Neurochirurgie* 56, 467-476.
- Gatignol, MC., Etienne, JC. (2010). Rapport sur pesticides et santé. OPECST. 1-262.
- Gilbert, MR., Dignam, JJ., Armstrong, TS., Wefel, JS., Blumenthal, DT., Vogelbaum, MA., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, PD., Jaeckle, KA., Schiff, D., Stieber, VW., Brachman, DG., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, IW., Sulman, EP., Aldape, KD., Curran, WJ., Mehta, MP. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 370, 699-708.
- Gire, V., Wynford-Thomas, D. (1999). La sénescence dans les cellules humaines : un obstacle au développement tumoral ? *Médecine/Sciences* 15, 1096-1104.

- Gordon, RR., Nelson, PS. (2012). Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resistance Updates* 15, 123-131.
- Gratas, C., Séry, Q., Rabé, M., Oliver, L., Vallette, FM. (2014). Bak and Mcl-1 are essential for Temozolomide induced cell death in human glioma. *Oncotarget* 5, 2428-2435.
- Guéret, E. (2012). La mort est dans le pré.
- Guyton, KZ., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K. (2016). Carcinogenicity of pentachlorophenol and some related compounds. *The Lancet Oncology* 17, 1637-1638.
- Han, G., Zhao, W., Wang, L., Yue, Z., Zhao, R., Li, Y., Zhou, X., Hu, X., Liu, J. (2014). Leptin enhances the invasive ability of glioma stem-like cells depending on leptin receptor expression. *Brain Research* 1543, 1-8.
- Hundsberger, T., Hottinger, AF., Roelcke, U., Roth, P., Migliorini, D., Dietrich, PY., Conen, K., Pesce, G., Hermann, E., Pica, A., Gross, MW., Brügge, D10., Plasswilm, L10., Weller, M., Putora, PM (2016). Patterns of care in recurrent glioblastoma in Switzerland: a multicentre national approach based on diagnostic nodes. *Journal of Neurooncology* 126, 175-83.
- Hochane, M., Trichet, V., Pecqueur, C., Avril, P., Oliver, L., Denis, J., Brion, R., Amiaud, J., Pineau, A., Naveilhan, P., Heymann, D., Vallette, FM., Olivier, C. (2017). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Senescence in Normal Mesenchymal Stem Cells (MSC) and Promotes Tumorigenic Phenotype in Premalignant MSC. *Stem Cells* 35, 800-811.
- Hossain, A., Gumin, J., Gao, F., Figueroa, J., Shinojima, N., Takezaki, T., Priebe, W., Villarreal, D., Kang, SG., Joyce, C., Sulman, E., Wang, Q., Marini, FC., Andreeff, M., Colman, H., Lang, FF1. (2015). Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway. *Stem Cells* 33, 1-32.
- Ined. (2019). Population par groupe d'âges au 1^{er} janvier 2019.
- INRS (2012). Tableau n°58 du régime agricole.
- INRS (2015). Tableau n°59 du régime agricole.
- Jacquesson, T., Ducray, F., Maucort-Boulch, D., Armoiry, X., Louis-Tisserand, G., Mbaye, M., Pelissou-Guyotat, I., Guyotat, J. (2012). Surgery of high-grade gliomas guided by fluorescence: A retrospective study of 22 patients. *Neurochirurgie* 59, 9-16.
- Kamur. (2014). Anatomy and Physiological aspects of glial cells, Role in Health and Disease. *Health & Medicine, Technology*, 1.
- Karnoub, AE., Dash, AB., Vo, AP., Sullivan, A., Brooks, MW., Bell, GW., Richardson, AL., Polyak, K., Tubo, R., Weinberg, RA. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.
- Lamure, S., Fabbro-Perray, P. (2017). Etude du rôle de l'exposition professionnelle aux pesticides dans le pronostic des Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B. 1-90.
- Leveque, X., Hochane, M., Geraldo, F., Dumont, S., Gratas, C., Oliver, L., Gaignier, C., Trichet, V.,

- Layrolle, P., Heymann, D., Herault, O., Vallette, FM., Olivier, C. (2019). Low-Dose Pesticide Mixture Induces Accelerated Mesenchymal Stem Cell Aging In Vitro. *Stem Cells*, 1-12.
- Lévy, S., Chapet, S., Mazon, J. (2014). Prise En Charge Des Gliomes. *Cancer/Radiothérapie* 18, 461–467.
- Louis, DN., Ohgaki, H., Wiestler, OD., Cavenee, WK., Burger, PC., Jouvett, A., Scheithauer, BW., Kleihues P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Ma, C., Bandukwala, S., Burman, D., Bryson, J., Seccareccia, D., Banerjee, S., Myers, J., Rodin, G., Dudgeon, D., Zimmermann, C. (2010). Interconversion of three measures of performance status: an empirical analysis. *Eur J Cancer* 46, 3175-3183.
- Makinoshima, H., Dezawa, M. (2009). Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway. *FEBS Letter* 583, 3697-3703.
- Molnár, J., Mucsi, I., Engi, H., Spengler, G., Amaral, L., Zalatnai, A., Wang, Q., Shlomo, BE. (2013). The Role of Stroma in Tumour-Host Co-Existence: Some Perspectives in Stroma-Targeted Therapy of Cancer. *Biochemistry & Pharmacology* 2.
- Monnereau, A., Troussard, X., Belot, A., Guizard, AV., Woronoff, AS., Bara, S., Lapôtre-Ledoux, B., Iwaz, J., Tretarre, B., Maynadié, M. (2013) Unbiased estimates of long-term net survival of hematological malignancy patients detailed by major subtypes in France. *International Journal of Cancer* 132, 2378–2387.
- MSA. (2018). Population active agricole, La part des femmes en agriculture en 2016. MSA Info Stat Presse.
- MSA. (2019). Chiffres utiles de la MSA – Edition 2019. MSA Caisse centrale.
- Orton, F., Ermler, S., Kugathas, S., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A. (2014). Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology* 278, 201-208.
- Ostrom, Q., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. (2015). CBTRUS Statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncology* 17, 1–62.
- Osuka, S., Sampetean, O., Shimizu, T., Saga, I., Onishi, N., Sugihara, E., Okubo, J., Fujita, S., Takano, S., Matsumura, A., Saya, H. (2013). IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31, 627-640.
- Park, CK., Kim, JH., Nam, DH., Kim, CY., Chung, SB., Kim, YH., Seol, HJ., Kim, TM., Choi, SH., Lee, SH., Heo, DS., Kim, IH., Kim, DG., Jung, HW. (2013). A practical scoring system to determine whether to proceed with surgical resection in recurrent glioblastoma. *Neuro Oncology* 15, 1096-1101.
- Pittenger, MF., Mackay, AM., Beck, SC., Jaiswal, RK., Douglas, R., Mosca, JD., Moorman, MA., Simonetti, DW., Craig, S., Marshak, DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Provost, D., Cantagrel, A., Lebailly, P., Jaffré, A., Loyant, V., Loiseau, H., Vital, A., Brochard, P., Baldi, I. (2007). Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occupational and Environmental Medicine* 64, 509-14.

Ruder, AM., Carreón, T., Butler, MA., Calvert, GM., Davis-King, KE., Waters, MA., Schulte, PA., Mandel, JS., Morton, RF., Reding, DJ., Rosenman, KD. (2009). Exposure to Farm Crops, Livestock, and Farm Tasks and Risk of Glioma: The Upper Midwest Health Study. *American Journal of Epidemiology* 169, 1479-1491.

Shan, T., Chen, S., Chen, X., Lin, WR., Li, W., Ma, J., Wu, T., Chui, X., Ji, Y., Kang, Y. (2017). Cancer-associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism. *Oncology reports*, 1971-1979.

Singh, S., Srivastava, SK., Bhardwaj, A., Owen, LB., Singh, AP. (2010). CXL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy. *British Journal of Cancer* 103, 1671-1679.

Singh, SK., Hawkins, C., Clarke, ID., Squire, JA., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, M., Cusimano, MD., Dirks, PB. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
Singh, SK., Mishra, MK., Eltoum, IA., BAE, S., Lillard, JW., Singh, R. (2018). CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Scientific Reports* 8, 1323.

Su, S., Chen, J., Yao, H., Liu, J., Yu, S., Lao, L., Wang, M., Luo, M., Xing, Y., Li, M., Liu, Q., Song, E. (2018). CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemo-resistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell* 172, 841-856.

Stupp, R., Mason, WP., Van den Bent, MJ., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, MJ., Belanger, K., Brandes, AA., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, RC., M.D., Ludwin, SK., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, JG., Eisenhauer, E., Mirimanoff, RO. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352, 987-996.

Taal, W., Oosterkamp, HM., Walenkamp, AM., Dubbink, HJ., Beerepoot, LV., Hanse, MC., Buter, J., Honkoop, AH., Boerman, D., De Vos, FY., Dinjens, WN., Enting, RH., Taphoorn, MJ., Van Den Bergmortel, FW., Jansen, RL., Brandsma, D., Bromberg, JE., Van Heuvel, I., Vernhout, RM., Van Der Holt, B., Van Den Bent, MJ. (2014). Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial) : a randomized controlled phase 2 trial. *Lancet oncology* 15, 943-953.

Teicher, BA., Fricker, SP. (2010). CXCL-12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in cancer. *Clinical Cancer Research* 16, 2927-2931.

Tsuyada, A., Chow, A., Wu, J., Somlo, G., Chu, P., Loera, S., Luu, T., Li, AX., Wu, X., Ye, W., Chen, S., Zhou, W., Yu, Y., Wang, YZ., Ren, X., Li, H., Scherle, P., Kuroki, Y., Wang, SE. (2012). CCL2 mediates crosstalk between cancer cells and stromal fibroblasts that regulates breast cancer stem cells. *Cancer research* 72, 2768-2779.

UIPP. (2016). UIPP : traitements SOeS.

- Wang, J., Sakariassen, PO., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, SO., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., Molven, A., Bjerkvig, R., Enger, PO. (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *International Journal of Cancer* 122, 761–768.
- Wang, H., Lathia, JD., Wu, Q., Wang, J., Li, Z., Heddleston, JM., Eyler, CE., Elderbroom, J., Gallagher, J., Schuschu, J., MacSwords, J., Cao, Y., McLendon, RE., Wang, XF., Hjelmeland, AB., Rich, JN. (2009). Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells* 27, 2393-2404.
- Wick, W., Puduvalli, VK., Chamberlain, MC., Van den Bent, MJ., Carpentier, AF., Cher, LM., Mason, W., Weller, M., Hong, S., Musib, L., Liepa, AM., Thornton, DE., Fine, HA. (2010). Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 28, 1168-1174.
- Weathers, SP., Han, X., Liu, DD., Conrad, CA., Gilbert, MR., Loghin, ME., O'Brien, BJ., Penas-Prado, M., Puduvalli, VK., Tremont-Lukats, I., Colen, RR., Yung, WK., De Groot, JF. (2016). A randomized phase II trial of standard dose bevacizumab versus low dose bevacizumab plus lomustine (CCNU) in adults with recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* 12.
- Whiteside, TL. (2018). Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*, 1-11.
- Yang, Y., Bucan, V., Baehre, H., Von der Ohe, J., Otte, A., Hass, R. (2015). Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes. *International Journal of Oncology*, 244-252.
- Yi, Y., Hsieh, IY., Huang, X., Li, J., Zhao, W. (2016). Glioblastoma stem-like cells: Characteristics, microenvironment, and therapy. *Frontiers in Pharmacology* 7, 477.
- Zhang, G., Huang, S., Wang, Z. (2012). A meta-analysis of bevacizumab alone and in combination with irinotecan in the treatment of patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience* 19, 1636-1640.
- Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daude, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D. (2012). French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects. *Neurochirurgie* 58, 4-13.

Annexes

Annexe I : fiche de soumission de projet



Fiche soumission de projet

Date de soumission : 23 janvier 2019

Porteur du projet :

Nom : Berthy Elise - interne en pharmacie au CHRU de Tours (rattachée à la Faculté de Pharmacie de Poitiers)

N° Tel : 06 88 51 67 70

Email : elise.berthy@gmail.com

Adresse : CHRU de Tours - Hôpital Bretonneau

2 boulevard Tonnelle

37044 Tours Cédex 9

Nom et coordonnées du responsable administratif : / (Senior responsable : Virginie André – PH responsable de l'unité de biopharmacie clinique oncologique)

Laboratoire(s)/équipes associée(s) : /

DESCRIPTIF DU PROJET

Titre du projet* : étude de l'impact de l'exposition professionnelle aux pesticides sur l'incidence, l'agressivité et la réponse au traitement des glioblastomes

Résumé en français :

Le glioblastome est la tumeur primaire cérébrale la plus fréquente, et certains facteurs environnementaux, tels que les pesticides, interviennent comme facteurs de risques majorant son apparition. Au cours de mon année recherche réalisée au sein de l'équipe 9, Apoptose et progression tumorale, du Centre de recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, nous avons constaté qu'un mélange de 7 pesticides (chaque pesticide a été utilisé à la dose d'extrapolation *in vitro* de sa dose journalière admissible) pourrait entraîner l'apparition d'une population tumorale gliale plus agressive et plus invasive.

Dans le cadre de ma thèse de fin d'internat, j'aimerais poursuivre ce projet via une étude clinique. Il s'agirait de comparer rétrospectivement la réponse au traitement des sujets professionnellement exposés aux pesticides à celle des sujets non professionnellement exposés : comparaison de la survie globale ou encore du délai de survenue de rechutes.

Résumé en anglais :

Glioblastoma is the most primary brain tumor. Some environmental factors, such as pesticides, promote its occurrence. During my research year in the team 9, Apoptosis and tumor progression, of Nantes Angers Cancer and Immunology Center, we found that a mixture of 7 pesticides (each pesticide was used at the *in vitro* extrapolation dose of its acceptable daily intake) could lead to the development of a more aggressive and invasive glial tumor population.

As part of my thesis, I would like to continue this project via a clinical study. This would be a retrospective comparison of the response to treatment of subjects occupationally exposed to pesticides to that of non-occupationally exposed subjects : comparison of overall survival or time to relapse.

Objectifs / Approche / Résultats attendus :

Etude rétrospective, multicentrique, sur 200 patients.

Constitution de 2 groupes : les patients professionnellement exposés (agriculteurs, patients travaillant dans l'industrie des pesticides, dans l'entretien du bois, dans l'entretien des voiries ou des espaces verts) et les non professionnellement exposés.

Comparaison de la survie globale, du délai de survenue de rechutes.



Fiche soumission de projet

BUDGET

Pas de Budget

Devis proposé en fonction de la demande

Financement demandé / Organisme : /

Financement obtenu : /

Durée (dates de début/fin prévues) : /

Les frais et l'organisation des transports sont à la charge du demandeur. (ainsi que la commande de carboglace si applicable)

DESCRIPTION DES BESOINS :

Critères de sélection des patients	
nombre de patients	200
analyses génétiques	/
Quels types de données cliniques	Réponse au traitement : - Survie globale - Délai de survenue de rechute - Statut MGMT
Quels types de données biologiques et quantités	Non concerné
Besoins en imagerie	non
Description des besoins	
Durée de la recherche pour laquelle nous donnons accès aux échantillons	Accès seulement aux données de la base pour une période de 10 mois (thèse à soutenir au plus tard en octobre 2019)
Modalités de transmission des échantillons : (A la charge du demandeur) ▪ Transport organisé quelle société (n° compte) ▪ qui fournit l'emballage ▪ Quelles conditions de transport (carboglace ? fournir n° Compte fournisseur)	Non concerné
Adresse de destination des échantillons avec numéro de tel et fax	/
Nom de la personne en charge de la négociation du contrat	/
Adresse de facturation	/
Date à laquelle vous souhaiteriez disposer des échantillons :	/

ne pas remplir cette partie :

Date de réception de la présente demande par le Coordinateur : 23/01/2019

Date de délibération du Comité Directeur : 03/02/2019

Demande d'avis d'expert : ☐ oui ☒ non Si oui, nom du(des) expert(s) :

Avis rendu par le Comité Directeur : ☒ favorable ☐ défavorable

Commentaire : Questions du consortium sur absence de conflit d'intérêt et plan statistique envisagé. Accord du consortium après réponses du demandeur

(*) un projet de 5 pages maximum, sur papier libre et rédigé en anglais, pourra accompagner cette fiche

Cette fiche est à adresser au Pr Mensei : phmensei@chu-angers.fr ou à la coordination de la base : Mme Soulard Gwenélie gwsoulard@chu-angers.fr

Merci

LETTRE D'INFORMATION DU PATIENT AU SUJET DU PROGRAMME :

« CONSTITUTION DE BASES DE DONNEES CLINICO-BIOLOGIQUES MULTIDISCIPLINAIRES, MULTICENTRIQUES NATIONALES A VISEE DE RECHERCHE ET D'EVALUATION DES SOINS A PARTIR DE PATIENTS PRESENTANT UNE TUMEUR DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL »

Madame, Mademoiselle, Monsieur,

Afin de permettre l'égalité de l'accès aux soins sur l'ensemble du territoire et de favoriser la recherche sur les tumeurs cérébrales, plusieurs réseaux de soins et/ou bases de données clinico-biologiques ont été créés autour de ces tumeurs : la Base de données Clinico-Biologiques de Glioblastomes (BCB-G ou French Glioblastoma Biobank), le réseau LOC pour les lymphomes oculo-cérébraux, le réseau POLA pour les tumeurs oligodendrogiales de haut-grade, le réseau TUCERA pour les tumeurs cérébrales rares avec son sous-groupe, le réseau GLITRAD pour les gliomes du tronc cérébral de l'adulte et le réseau RENOCILIP, réseau de référence national sur les tumeurs rares du système nerveux central.

L'ensemble de ces réseaux et bases de données ne peut se constituer sans votre participation et cette lettre d'information a pour objectif de vous délivrer toute l'information nécessaire sur votre rôle, les risques, les contraintes et les bénéfices liés à cette participation qui ne peut se faire sans le recueil de votre consentement. Cette information concerne chacune de ces structures dont les équipes collaborent et mettent leurs actions en commun.

Selon le résultat d'analyse de votre prélèvement tumoral au bloc opératoire, vous participerez à l'une des bases de données clinico-biologiques citées précédemment : BCB-G, LOC, POLA, TUCERA, GLITRAD ou RENOCILIP.

Quels sont les objectifs de ces programmes et en quoi consistera votre participation ?

L'objectif de ces programmes est, d'une part, la détermination de facteurs de risque et, d'autre part, l'amélioration des connaissances pour le diagnostic et le traitement des tumeurs cérébrales nécessitant de réunir et analyser une masse importante d'échantillons biologiques et de données cliniques associées. C'est en effet à partir du rapprochement entre les résultats d'analyses des prélèvements biologiques et les données cliniques des maladies et leur évolution que des projets pourront être développés par des équipes de recherche.

Durant votre prise en charge à l'hôpital, des prélèvements biologiques et examens radiologiques pourront être effectués afin d'établir la nature de votre maladie et d'adapter le traitement qui vous sera proposé. Les prélèvements ne sont pas toujours utilisés en totalité et les surplus biologiques générés sont détruits. Votre participation consistera à autoriser d'une part que soit réalisé un prélèvement sanguin supplémentaire dédié au programme vous concernant et, d'autre part, à autoriser la conservation et l'utilisation à des fins de recherche de ce prélèvement dédié, des surplus biologiques, données d'examens radiologiques et données cliniques associées, dans les conditions détaillées ci-après.

Quels prélèvements et quelles données sont concernés ?

- un prélèvement de la tumeur et en limite de la tumeur sera réalisé lors de l'intervention chirurgicale,
- un prélèvement de sang ou tout autre liquide biologique (liquide céphalo-rachidien, corps vitré de l'œil, etc...) avant la chirurgie,
- un prélèvement de sang après la chirurgie et avant le traitement complémentaire, pendant votre suivi (BCB-G),
 - un prélèvement de cheveux (ou poils pubiens ou aisselles) qui sera réalisé au bloc opératoire, durant le rasage à minima effectué avant l'intervention ou lors d'une consultation (BCB-G),
- un prélèvement de graisse sous cutanée éventuellement effectué au niveau de l'incision lors de l'intervention chirurgicale (BCB-G),
- En cas de nouvelle chirurgie au cours de votre suivi, les mêmes prélèvements de sang et de tumeur seront également prélevés et conservés. (BCB-G)

Comment sont gérés ces prélèvements et données recueillies ?

Tous les échantillons prélevés dans le cadre de ces réseaux et bases de données seront conservés sous forme codée, pour une durée illimitée. Ces échantillons seront stockés, dans le service dédié de votre hôpital de prise en charge, appelé Centre de Ressources Biologiques (CRB) – Tumorothèque, chargé de gérer les échantillons biologiques pour la recherche, de manière anonyme et confidentielle grâce à un système informatique spécialisé et agréé par la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés). Pour la BCB-G, un envoi annuel de vos échantillons sera réalisé vers le CRB du CHU d'Angers pour conservation. Ainsi les ressources biologiques pourront être mises à disposition des chercheurs, après accord d'un comité scientifique, dans le respect des lois et de l'éthique.

Des données cliniques et radiologiques associées à ces échantillons et en rapport avec votre maladie, seront recueillies à partir de votre dossier médical. Les données recueillies seront enregistrées de manière anonyme, dans une base de données informatique, par du personnel hospitalier disposant de codes d'accès et tenu au respect du secret professionnel.

Dans tous les cas, le transfert des données vous concernant se fera en toute confidentialité sous forme codée et votre identité ne sera jamais révélée.

Quelles analyses fait-on à partir de ces prélèvements ?

Des recherches de marqueurs biochimiques ou génétiques seront pratiquées à partir de l'échantillon de votre tumeur mais également de vos liquides biologiques de manière anonyme. L'étude de vos caractéristiques génétiques, à l'exclusion de vos caractéristiques identifiantes, a pour but de comprendre le développement des tumeurs et leur réponse aux traitements.

Les cheveux (ou poils) et la graisse sous cutanée reflètent, en les accumulant, les expositions récentes à des produits chimiques environnementaux (comme les pesticides), dont le rôle dans les tumeurs cérébrales peut être suspecté.

Pour la BCB-G, des cellules issues de votre tumeur pourront être conservées dans des conditions permettant la création de populations cellulaires de glioblastomes, à destination des chercheurs souhaitant étudier ces populations particulières de cellules.

Quelle incidence sur votre prise en charge ?

Quel que soit votre choix, que vous acceptiez ou que vous refusiez la conservation et l'utilisation de vos données clinico-biologiques à des fins de recherche, votre prise en charge s'effectuera de la même manière. De plus, même si vous acceptez aujourd'hui, vous pourrez à tout moment revenir sur votre décision sans que cela n'impacte votre prise en charge.

Protection des personnes

Non patrimonialité du corps humain (articles 16-1 et 16-6 du code civil) : Vos prélèvements ne pourront ni être cédés à titre commercial ni donner lieu à une rémunération.

Données à caractère personnel : conformément au règlement général sur la protection des données et la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous disposez à l'égard des données médicales associées aux prélèvements d'un droit d'accès, d'effacement, de rectification, de limitation et de portabilité de vos données. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret médical susceptibles d'être utilisées dans le cadre de cette recherche. Si vous retirez votre consentement au cours de la recherche, les données déjà recueillies seront traitées sauf opposition de votre part. Cependant ce droit ne pourra pas s'exercer si l'effacement de vos données devait rendre impossible ou compromettre l'analyse des données de la recherche.

Si vous avez des questions ou réclamations à formuler concernant la gestion de vos données personnelles, merci de prendre contact avec le médecin qui vous suit dans le cadre de la recherche. Si vous avez des questions sur la protection des données dans le cadre de la recherche, vous pouvez contacter le Délégué à la Protection des données de votre hôpital de prise en charge.

La Commission Nationale Informatique et Libertés (<https://www.cnil.fr>) est l'autorité française habilitée à recevoir toute réclamation officielle concernant le traitement de vos données.

Vous pouvez également accéder, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de votre choix, à l'ensemble de vos données médicales.

Recherche scientifique et recherche génétique : la loi de bioéthique du 6 août 2004 précise que les éléments du corps humain peuvent être utilisés à des fins de recherche scientifique à la condition que la personne dont ils sont issus ait été informée et ne s'y soit pas opposée. De plus, aucun examen de vos caractéristiques génétiques héréditaires ne sera réalisé sans votre consentement spécifique écrit.

Gestion des ressources biologiques pour la recherche : le décret 2007- 1220 du 10 Août 2007 précise que les éléments du corps humain utilisés à des fins de recherche scientifique doivent être gérés par des Centres de Ressources Biologiques déclarés et autorisés (arrêté du 16 Août 2007).

Autorisations : ce programme a été autorisé par le Ministère de la Recherche et l'Agence Régionale de Santé et a reçu un avis favorable du Comité de Protection des Personnes CPP Ouest II (Angers) le 19 février 2013. Les bases de données associées à ce programme ont fait l'objet d'une autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés.

Médecin associé à la recherche : Nom Prénom :

Date : Signature du médecin :

Ce document vous appartient et vous pouvez le communiquer à votre médecin traitant ou à vos proches pour avis

Fait en 2 exemplaires originaux, datés et signés par le médecin associé au projet.

- 1 exemplaire ou volet rose conservé par la personne donnant son consentement
- 1 exemplaire ou volet blanc conservé par le responsable de la recherche (dossier patient)

Annexe III : recueil consentement patient

Information / Recueil du Consentement du patient

Versions validées CPP OUEST II ANGERS le 5 novembre 2016

FORMULAIRE DE RECUEIL DE CONSENTEMENT / NON OPPOSITION POUR PARTICIPATION AU PROGRAMME :

« CONSTITUTION DE BASES DE DONNEES CLINICO-BIOLOGIQUES MULTIDISCIPLINAIRES, MULTICENTRIQUES
NATIONALES A VISÉE DE RECHERCHE ET D'EVALUATION DES SOINS
A PARTIR DE PATIENTS PRESENTANT UNE TUMEUR DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL »

Votre participation se fera dans le cadre des projets : POLA, TUCERA, BCB-G, LOC, GLITRAD ou RENOCCLIP,
selon les résultats d'analyses de vos prélèvements chirurgicaux

Je soussigné, (NOM, Prénom du patient)....., né(e) le...../...../.....

Ou **Signature de représentants légaux** : la signature d'un consentement par un majeur sous sauvegarde de justice est valable. Celle d'un majeur sous tutelle l'est également, à condition qu'il soit assisté par son curateur et que la preuve de l'assistance du curateur figure sur le formulaire de consentement ou dans le dossier médical. Enfin, le consentement du majeur sous tutelle n'est pas suffisant. Il est recueilli selon le degré de discernement du majeur protégé mais l'autorisation du tuteur est toujours nécessaire.

Ou **Signature d'un proche** si l'état du patient le nécessite :

Je(nous) soussigné(s), Et
agissant en tant que ☐ représentant(s) légal(aux) , ☐ proche de :
(Nom, prénom du patient)....., né(e) le...../...../.....

Déclare avoir pris connaissance de la lettre d'information relative à ce programme et avoir ainsi été informé(e) par le Dr..... conformément à la loi N° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique :

- de la nature du programme et de ses buts, notamment pour sa partie d'étude de ses caractéristiques génétiques sans finalité identifiante,
- que ce programme et la conservation des échantillons qui y est associée, a reçu pour sa mise en œuvre, un avis favorable du Comité de Protection des Personnes Angers Ouest II le 19 février 2013,
- que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer et que ce choix n'aura aucune conséquence sur la qualité de ma prise en charge médicale habituelle,
- que je suis libre à tout moment de révoquer mon consentement et demander la destruction de mes échantillons sans conséquence sur la qualité de ma prise en charge médicale,
- des modalités de gestion de mes prélèvements biologiques par le Centre de ressources biologiques de l'hôpital où je suis pris en charge et notamment concernant leur conservation pour une durée illimitée, même si je venais à décéder, leur utilisation à des fins de recherche dans le domaine des tumeurs cérébrales, ainsi que leur cession à d'autres chercheurs publics ou privés du territoire national ou international, pour des études dans le même domaine de recherche tout en garantissant la confidentialité de mes données,
- que les données cliniques associées à mes prélèvements seront conservées sous forme codée, resteront strictement confidentielles et qu'à aucun moment mes données personnelles n'apparaîtront en cas de publication scientifique,
- que certaines données nominatives me concernant feront pour ce programme l'objet d'un traitement informatisé en vertu de la loi "Informatique et Libertés" du 6 janvier 1978 modifiée (notamment par la loi N° 2004-801 d'août 2004). J'ai été informé de la nature des informations transmises, de la finalité du traitement des données, de mon droit d'accès, modification, effacement, de limitation et rectification par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix, de mon droit de m'opposer au traitement automatisé des données me concernant.

Je déclare également avoir reçu toutes les réponses souhaitées à mes questions ;

Compte tenu de toutes les informations reçues,

J'accepte librement et volontairement de participer à ce programme

oui ☐

non ☐

Fait à :
Le :
Signature du patient, du proche ou représentant légal :

Fait à :
Le :
Signature du médecin :

Un exemplaire original signé de ce formulaire de consentement et un exemplaire original de la lettre d'information m'ont été remis.

Fait en 3 exemplaires distincts, datés et signés :

- 1 exemplaire du volet rose conservé par la personne donnant son consentement
- 1 exemplaire du volet blanc conservé par le médecin responsable de la recherche (dans le dossier patient)
- 1 exemplaire du volet bleu conservé par le Centre de Ressources Biologiques de l'Hôpital.



**GROUPE ETHIQUE D'AIDE A LA RECHERCHE CLINIQUE POUR LES PROTOCOLES DE
RECHERCHE NON SOUMIS AU COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES
ETHICS COMMITTEE IN HUMAN RESEARCH**

AVIS

Responsable de la recherche : Dr Virginie ANDREE / Elise BERTHY

Titre du projet de recherche : Etude de l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur l'agressivité et la réponse au traitement des glioblastomes

N° du projet : 2019 052

Le groupe éthique d'aide à la recherche clinique donne un avis

☒ FAVORABLE

☐ DÉFAVORABLE

☐ SURSIS A STATUER

☐ DÉCLARATION D'INCOMPÉTENCE

au projet de recherche n° 2019 052

A Tours, le 03 Juin 2019

Dr Béatrice Birmelé
Présidente du Groupe Ethique Clinique

Annexe V : détail des traitements radio-chimiothérapeutiques

	Patients exposés	Patients non exposés
Traitement 1 ère intention		
Stupp	34	159
Stupp + bévacicumab	4	10
Témozolomide	3	0
Témozolomide + bévacicumab	1	2
Radiothérapie seule	0	2
Pas de traitement	6	3
NR	2	1
Traitement 1ère rechute		
Stupp	0	4
Stupp + bévacicumab	1	1
Témozolomide	2	17
Témozolomide + bévacicumab	0	4
Lomustine	2	4
Lomustine + bévacicumab	8	22
Lomustine + Témozolomide + bévacicumab + irinotécan	0	1
Lomustine + procarbazine + vincristine	0	1
Fotémustine	0	1
Fotémustine + bévacicumab	3	8
Carmustine	1	12
Bévacicumab + irinotécan	4	12
Bévacicumab	4	17
Carboplatine + étoposide	0	2
Carboplatine	0	1
Cyclophosphamide	0	2
Dépatuxizumab mafodotine	0	3
Crizotinib	0	1
Verunafenib	0	1
anti-FGFR3	0	1
Radiothérapie seule	0	3
Pas de traitement	12	33
NR	0	1

Résumé

La population mondiale est exposée aux pesticides, notamment, *via* l'alimentation puisque 90% des aliments sont contaminés par au moins un pesticide. Cette exposition est réglementée mais seulement pour chaque pesticide pris individuellement : la sécurité des associations, liées à l'utilisation ou à l'exposition environnementale, n'est pas évaluée. Or les individus ne sont pas exposés à un seul pesticide mais à un mélange de pesticides puisque près de 40% des aliments sont poly-contaminés. Les effets, à long terme, de cette poly-exposition chronique de faibles doses de pesticides sont, encore à ce jour, peu connus. Cette thèse se compose de deux études : une étude fondamentale visant à évaluer les conséquences de la poly-exposition chronique, à un mélange de 7 pesticides (couramment retrouvés ou ayant été couramment retrouvés dans l'alimentation), d'un acteur clef du micro-environnement tumoral, les CAF (Cancer Associated Fibroblasts), issus de MSC (Cellules Souches Mésenchymateuses) sur l'agressivité et la résistance au traitement des cellules tumorales gliales ; et une étude clinique visant à étudier l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale, sur la survie sans rechute et l'âge au diagnostic des patients atteints de glioblastome.

Pour réaliser l'étude fondamentale, deux modèles *in vitro* ont été mis en place : un modèle de co-culture CAF pré-exposés aux pesticides-primoculture de glioblastome (GBM) et un modèle d'exposition d'une primoculture de GBM au milieu conditionné de CAF pré-exposés aux pesticides. Il a alors été montré que l'exposition chronique des CAF aux pesticides pourrait entraîner un enrichissement en cellules souches cancéreuses (CSC), une surproduction de CCL5, une surexpression des gènes *prolactine* et *leptine*, connues pour favoriser l'invasion tumorale. Ainsi, l'exposition chronique des CAF aux pesticides pourrait conduire à l'apparition d'une population tumorale plus agressives et plus invasives.

En outre, une étude clinique nationale, rétrospective, multicentrique, réalisée sur 227 patients (50 patients atteints de glioblastome et professionnellement exposés aux pesticides et 177 patients atteints de glioblastome mais non exposés aux pesticides) a mis en évidence une diminution de la survie globale des patients professionnellement exposés aux pesticides : la survie globale des patients professionnellement exposés aux pesticides est de 12.1 mois alors qu'elle est de 16 mois pour les non exposés. Une analyse multivariée, réalisée grâce au modèle Cox, n'a pas pu mettre en évidence l'impact direct de l'exposition chronique aux pesticides dans cette diminution de survie.

Toutefois, une différence de prise en charge significative entre les 2 groupes de patients a été constatée : les patients professionnellement exposés aux pesticides sont moins pris en charge par exérèse et par le protocole Stupp, protocole de référence, que les patients non exposés. Il devient alors important de comprendre cette différence de prise en charge. Elle est probablement due au fait que 1.7 fois plus de patients exposés aux pesticides est plus de 70 ans. Le pourcentage d'indice de Karnosky inférieur à 60 % semble également être plus important dans le groupe patients exposés. Cette différence de prise en charge pourrait également être due à une différence de localisation tumorale ou d'invasivité. Dès lors, une comparaison de la localisation tumorale des patients exposés et non exposés semble intéressante.

Mots clefs : pesticides, glioblastome, Cellules Souches Mésenchymateuses, Cancer Associated Fibroblast, microenvironnement tumoral, résistance thérapeutique, agressivité et invasivité tumorale

SERMENT DE GALIEN

~~~~~

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

**D'**honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**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 l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

**Q**ue les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Q**ue je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

# Résumé

La population mondiale est exposée aux pesticides, notamment, *via* l'alimentation puisque 90% des aliments sont contaminés par au moins un pesticide. Cette exposition est réglementée mais seulement pour chaque pesticide pris individuellement : la sécurité des associations, liées à l'utilisation ou à l'exposition environnementale, n'est pas évaluée. Or les individus ne sont pas exposés à un seul pesticide mais à un mélange de pesticides puisque près de 40% des aliments sont poly-contaminés. Les effets, à long terme, de cette poly-exposition chronique de faibles doses de pesticides sont, encore à ce jour, peu connus. Cette thèse se compose de deux études : une étude fondamentale visant à évaluer les conséquences de la poly-exposition chronique, à un mélange de 7 pesticides (couramment retrouvés ou ayant été couramment retrouvés dans l'alimentation), d'un acteur clef du micro-environnement tumoral, les CAF (Cancer Associated Fibroblasts), issus de MSC (Cellules Souches Mésenchymateuses) sur l'agressivité et la résistance au traitement des cellules tumorales gliales ; et une étude clinique visant à étudier l'impact d'une exposition professionnelle aux pesticides sur la survie globale, sur la survie sans rechute et l'âge au diagnostic des patients atteints de glioblastome.

Pour réaliser l'étude fondamentale, deux modèles *in vitro* ont été mis en place : un modèle de co-culture CAF pré-exposés aux pesticides-primoculture de glioblastome (GBM) et un modèle d'exposition d'une primoculture de GBM au milieu conditionné de CAF pré-exposés aux pesticides. Il a alors été montré que l'exposition chronique des CAF aux pesticides pourrait entraîner un enrichissement en cellules souches cancéreuses (CSC), une surproduction de CCL5, une surexpression des gènes *prolactine* et *leptine*, connues pour favoriser l'invasion tumorale. Ainsi, l'exposition chronique des CAF aux pesticides pourrait conduire à l'apparition d'une population tumorale plus agressive et plus invasive.

En outre, une étude clinique nationale, rétrospective, multicentrique, réalisée sur 227 patients (50 patients atteints de glioblastome et professionnellement exposés aux pesticides et 177 patients atteints de glioblastome mais non exposés aux pesticides) a mis en évidence une diminution de la survie globale des patients professionnellement exposés aux pesticides : la survie globale des patients professionnellement exposés aux pesticides est de 12.1 mois alors qu'elle est de 16 mois pour les non exposés. Une analyse multivariée, réalisée grâce au modèle Cox, n'a pas pu mettre en évidence l'impact direct de l'exposition chronique aux pesticides dans cette diminution de survie.

Toutefois, une différence de prise en charge significative entre les 2 groupes de patients a été constatée : les patients professionnellement exposés aux pesticides sont moins pris en charge par exérèse et par le protocole Stupp, protocole de référence, que les patients non exposés. Il devient alors important de comprendre cette différence de prise en charge. Elle est probablement due au fait que 1.7 fois plus de patients exposés aux pesticides est plus de 70 ans. Le pourcentage d'indice de Karnofsky inférieur à 60 % semble également être plus important dans le groupe patients exposés. Cette différence de prise en charge pourrait également être due à une différence de localisation tumorale ou d'invasivité. Dès lors, une comparaison de la localisation tumorale des patients exposés et non exposés semble intéressante.

**Mots clefs :** pesticides, glioblastome, Cellules Souches Mésenchymateuses, Cancer Associated Fibroblast, microenvironnement tumoral, résistance thérapeutique, agressivité et invasivité tumorale