

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

EA 7501 GICC « Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire »
CNRS ERL 7001 LNOx « Leukemic Niche and redOx metabolism »

THÈSE présentée par :

Amélie FOUCAULT

soutenue le : 1^{er} décembre 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la vie et de la Santé**

Impact des pesticides sur le microenvironnement médullaire des hémopathies myéloïdes

THÈSE dirigée par :

M. HERAULT Olivier

PU-PH, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. LEBAILLY Pierre

MCF HDR, Université de Caen-Normandie

M. KOSMIDER Olivier

PU-PH, Université de Paris

PRESIDENT :

M. DELHOMMEAU François

PU-PH, Sorbonne Université, Paris

JURY :

M. DELHOMMEAU François

PU-PH, Sorbonne Université, Paris

M. HERAULT Olivier

PU-PH, Université de Tours

M. LEBAILLY Pierre

MCF HDR, Université de Caen-Normandie

M. KOSMIDER Olivier

PU-PH, Université de Paris

M. FARDEL Olivier

PU-PH, Université de Rennes 1

Mme FROMONT Gaëlle

PU-PH, Université de Tours

Remerciements.

Aux membres du jury

Monsieur le Professeur Olivier Hérault

Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de votre équipe de recherche. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet passionnant et actuel que j'ai pu poursuivre au fil des années. Je vous suis reconnaissante d'avoir su apporter tout au long de ces années votre exigence et votre sens critique, et de m'avoir accordé votre confiance dans la conduite de cette thèse. Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur François Delhommeau

Vous me faites honneur en acceptant de présider ce jury et de juger cette thèse. Je vous suis reconnaissante d'apporter votre expertise sur le sujet. Veuillez trouver ici ma sincère gratitude et mon respect.

Monsieur le Professeur Olivier Kosmider

Vous m'honorez en acceptant de juger cette thèse. Je vous suis reconnaissante de partager votre expérience et vos remarques que je recevrai avec grande attention. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respect.

Monsieur le Docteur Pierre Lebailly

Vous me faites honneur en acceptant de juger cette thèse. Je vous suis reconnaissante d'apporter votre expérience et vos remarques que je recevrai avec grande attention. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respect.

Monsieur le Professeur Olivier Fardel

Je suis honorée par votre présence au sein de ce jury. Je vous suis reconnaissante d'apporter votre jugement et votre expertise à cette thèse, ainsi que vos remarques. Soyez assuré de ma gratitude et de mon respect.

Madame le Professeur Gaëlle Fromont

Je suis honorée que vous ayez accepté de juger ce travail. Je vous suis reconnaissante d'apporter votre expertise sur le sujet. Veuillez trouver ici ma sincère gratitude et mon respect.

Aux membres de l'équipe de recherche LNOx

Je remercie Nathalie Langonne, Frédéric Picou, Jérôme Bourgeois et Myriam Koubi pour leurs conseils et leur aide dans la réalisation de ce projet. Vos conseils ont été précieux et m'ont permis de mener à bien toutes ces manip, surtout dans les périodes de découragement. Merci pour votre amitié, travailler avec vous est un véritable plaisir.

Je remercie le Docteur Nicolas Vallet qui s'est lancé avec moi dans cette expérience un peu folle de la méta-analyse. Merci pour ton aide si précieuse, ta bonne humeur et ta volonté de fer qui nous ont permis de mener à bien cette étude.

Je remercie également le Docteur Noémie Ravalet, avec qui j'ai partagé ces années d'internat, d'AHU, et de thèse de doctorat. Merci d'être là, un soutien au quotidien pour les jours difficiles mais aussi pour partager la belle aventure de la maternité !!

Je remercie le Docteur Joévin Besombes, qui a largement contribué à ce travail, qui ne s'est jamais découragé malgré les aléas des manip. Merci pour ton aide précieuse et ton amitié.

Merci également aux techniciennes de l'équipe de recherche qui m'ont beaucoup aidé et à tous les membres de l'équipe LNOx.

Aux membres du laboratoire d'hématologie biologique

Monsieur le Professeur Jorge Domenech

Merci Jorge pour votre soutien tout au long de ces années, même lorsque vous étiez parti pour votre nouvelle vie dans le Sud. J'ai beaucoup appris à vos côtés et j'espère être digne du flambeau que vous m'avez laissé.

Madame le Docteur Emmanuelle Rault

Merci Emmanuelle, pour tes enseignements en hématologie et surtout pour m'avoir transmis tes connaissances en cytologie. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Monsieur le Docteur Sébastien Lachot

Merci Seb, de m'avoir transmis tes enseignements et tes conseils au cours de ces dernières années. C'est un plaisir de travailler avec toi.

Monsieur le Docteur Cédric Aumont

Merci Cédric, pour tes conseils et ton aide au sein du service. C'est un plaisir de travailler avec toi.

Les praticiens hospitaliers attachés

Merci pour votre aide au quotidien, c'est un réel plaisir de travailler ensemble.

Les techniciens du laboratoire d'hématologie

Merci pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre bonne humeur.

Les secrétaires et les aides de laboratoire

Merci pour votre écoute et pour votre grande disponibilité au quotidien.

À ma famille et à mes amis.

À toi mon cœur

« Il y a des rencontres, des voyages, des mots, des visages qui changent à jamais notre vie... ». Tu as changé la mienne.... Merci pour cette belle famille que nous construisons ensemble. Merci pour ton soutien et ton amour de chaque instant.

À toi mon petit prince Mathys

À toi mon trésor, ma plus belle fierté, toi qui me donnes la force chaque jour de me surpasser. À toi que j'aime tant et pour toujours....

À mes parents

Le plus grand des mercis à vous qui m'avez accompagné durant toutes ces années, qui m'avez encouragée à toujours aller au bout de mes rêves et à surmonter les difficultés de la vie. Merci pour votre patience et votre amour.

À mon frère

Merci de m'avoir supporté durant toutes ces années, d'être toujours présent à mes côtés, je suis heureuse de t'avoir et qu'on soit aujourd'hui aussi proche.

À mes grands-parents

Merci d'avoir été aussi présents tout au long de ces années et de m'avoir toujours encouragée.

À ma belle famille

Merci de m'avoir si bien accueillie dans cette belle famille et d'être aussi présents dans notre vie.

À Émilie et Ophélie

Merci d'avoir été là toutes ces années, je suis heureuse de vous avoir dans ma vie et de me remémorer les nombreux souvenirs partagés ensemble. « L'amitié est comme une bouteille de vin, elle prend de la valeur avec le temps ». Déjà 30 belles années passées ensemble...

À Élise

Je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance il y a déjà de nombreuses années. Je suis heureuse de te compter parmi mes amis fidèles.

À Annabelle, Camille et Marion

Les bancs de la fac nous ont rapprochés, je suis heureuse de vous avoir rencontré et de vous avoir dans ma vie aujourd'hui. Merci pour votre amitié et pour tous ces bons moments partagés ensemble.

La science consiste à passer d'un étonnement à un autre. Aristote

Je dédie ce travail à mon papa, mes grands-pères et arrières grands-pères...

Liste des abréviations

ADI : *acceptable dose intake*
AGM : aorte gonade mésonéphros
AHS : *agricultural health study*
ALDH : aldéhydes déshydrogénases
ALDH2 : aldéhydes déshydrogénases 2
ANGPT1 : angiopoïétine 1
ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
CFU-baso : unité formatrice de colonies basophiles
CFU-E : unité formatrice de colonies érythrocytaires
CFU-Eo : unité formatrice de colonies éosinophiles
CFU-F : unité formatrice de fibroblastes
CFU-G : unité formatrice de colonies granulocytaires
CFU-GM : unité formatrice de colonies granulomonocytaires
CFU-M : unité formatrice de colonies monocytaires
CFU-ME : unité formatrice de colonies mégacaryocytaires-érythrocytaires
CFU-Meg : unité formatrice de colonies mégacaryocytaires
CIRC : centre international de recherche sur le cancer
CMN : cellules mononuclées
CSC : cellules souches cancéreuses
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CSM : cellules stromales mésenchymateuses
CSM-MO : CSM médullaire
CXCL12-CAR : CXCL12 *abundant reticular cell*
DCFDA : dichlorofluorescéine diacetate
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNP : dinitrophenol
DTC : dithiocarbamate
ECAR : *extracellular acidification rate*
EFSA : *european food safety authority*
ENNS : étude nationale de nutrition et santé
ETU : éthylène thio-urée
hNDI : *high nutritional daily intake* (équivalent à %ADI)
HSPC : *hematopoietic stem and progenitor cells*
IC : intervalle de confiance
IL6 : interleukine 6
INSERM : institut national de la santé et de la recherche médicale
IPSC : *induced pluripotent stem cells*
ISCT : *international society for cellular therapy*
LAM : leucémie aiguë myéloblastique
LIF : *leukemia inhibitory factor*
LLC : leucémie lymphoïde chronique
LMR : limites maximales de résidus
LNH : lymphome non hodgkinien
MEC : matrice extra-cellulaire
Meta-RR : meta-risque relatif
miR : micro-ARN
MM : myélome multiple

NCI/NTP : *National cancer institute / National toxicology program*

OCR : *oxygen consumption rate*

OMS : *organisation mondiale de la santé*

OPN : *ostéopontine*

OR : *odd ratio*

ROS : *reactive oxygen species*

SCF : *stem cell factor*

SEM : *standard error of the mean*

SMD : *syndrome myélodysplasique*

ST-CSH : *CSH à court terme*

TSH : *thyroid stimulating hormone*

Table des matières

Remerciements.....	2
Liste des abréviations.....	6
Avant-propos.....	12
PARTIE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	15
I. Les niches hématopoïétiques et leur microenvironnement	16
1) L'hématopoïèse et le concept de niche hématopoïétique	16
2) Les composants cellulaires de la niche hématopoïétique	18
3) Anomalies génétiques et moléculaires des CSM dans les SMD et les LAM	22
II. Le rôle des ALDH dans l'hématopoïèse et les hémopathies.	26
III. L'impact d'une exposition aux pesticides à fortes doses sur le risque de cancers.....	28
1) Généralités sur les pesticides	28
2) Pesticides à fortes doses et risque de cancers.....	29
3) Pesticides à fortes doses et risque d'hémopathies.....	32
4) Contamination de la population générale à proximité des zones agricoles	42
IV. L'impact d'une exposition aux pesticides à faibles doses sur le risque de cancers.....	43
1) Dosage et imprégnation de la population générale française par les pesticides	43
2) Les contaminations indirectes	45
3) La contamination de la chaîne alimentaire.....	46
V. Le manèbe et mancozèbe : deux pesticides d'intérêt.....	53
1) Généralités.....	53
2) Profil toxicologique des dithiocarbamates	53
3) Effet <i>in vitro</i>	54
PARTIE 2 : OBJECTIFS DE LA THESE	56
PARTIE 3 : IMPACT DES PESTICIDES SUR LE RISQUE DE LAM ET SUR LE MICROENVIRONNEMENT MÉDULLAIRE	58
I. Exposition professionnelle aux pesticides et le risque de LAM	59
1) Introduction.....	59
2) Synthèse	61
II. Exposition du microenvironnement médullaire à un cocktail de pesticides à faibles doses et le risque de syndromes myélodysplasiques	62
1) Introduction.....	62
2) Synthèse	64
III. Impact de l'exposition à faibles doses du manèbe, du mancozèbe sur le microenvironnement médullaire	65
1) Matériel et méthodes supplémentaires	65
2) Résultats supplémentaires	68
PARTIE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	71
Bibliographie	79
Annexe 1 : Pesticides classés par le CIRC.....	89

NB : Les différents articles ne rentrent pas dans la numérotation des pages et sont donc indépendants.

Table des Figures

Figure 1 : Schéma illustratif de la différenciation hématopoïétique	17
Figure 2 : Schéma illustratif d'un modèle d'hématopoïèse continu, dérivé du modèle de Waddington.	18
Figure 3 : Devenir des CSH	20
Figure 4 : Organisation cellulaire de la moelle osseuse hématopoïétique(25)	19
Figure 5 : Voies d'exposition aux pesticides	29
Figure 6 : Les facteurs influençant l'exposition aux pesticides des populations proches des zones agricoles(100)	Erreur ! Signet non défini.
Figure 7 : Représentation des pesticides dont les résidus retrouvés dans l'alimentation excèdent la limite autorisée, au cours de l'année 2008(122)	49
Figure 8 : Insecticides et acaricides les plus souvent détectés(119)	50
Figure 9 : Fongicides les plus souvent détectés(119)	50
Figure 10 : Représentation des pesticides dont les résidus retrouvés dans l'alimentation excèdent la limite autorisée, au cours de l'année 2016	51
Figure 11 : Pourcentage d'échantillons avec des résidus de pesticides simples ou multiples	52
Figure 12 : Structure chimique du manèbe et du mancozèbe	53
Figure 13 : Corrélation entre la consommation de pesticides et l'incidence des LAM en Asie	61
Figure 14 : Effet des pesticides sur la prolifération cellulaire des CSM après une exposition de 21 jours	68
Figure 15 : Effet des pesticides sur la sénescence des CSM après une exposition de 21 jours.	69
Figure 16 : Effet des pesticides sur l'expression du gène ALDH2 après une exposition de 21 jours des CSM	70

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Les causes de décès chez les agriculteurs</i> (69)	30
<i>Tableau 2 : Pesticides et cancers dans la cohorte AHS</i>	31
<i>Tableau 3 : Familles et substances actives impliquées dans les excès de risque de myélome multiple</i> (81)	34
<i>Tableau 4 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et myélome multiple</i> (81)	34
<i>Tableau 5 : Les familles et les substances actives impliquées dans les excès de risque de LNH</i> (81)	36
<i>Tableau 6 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et LNH</i> (81)	36
<i>Tableau 7 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et LH</i> (81)	37
<i>Tableau 8 : Familles et substances actives impliquées dans les excès de risque de leucémies</i> (81)	40
<i>Tableau 9 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et leucémies</i> (81)	41

Avant-propos

L'hématopoïèse est un processus crucial pour l'homéostasie de notre organisme, garantissant la production de cellules sanguines fonctionnelles et en quantité suffisante à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces dernières possèdent la capacité de s'autorenouveler ou de se différencier en cellules matures, deux propriétés qui nécessitent une régulation très fine pour ne pas épuiser le stock limité (pool) de CSH dont nous disposons tout en permettant une production cellulaire adaptée tout au long de la vie de l'individu. Il est maintenant établi que cette hématopoïèse est possible grâce au microenvironnement hyperspécialisé présent dans la moelle osseuse. La composition de ce microenvironnement médullaire est complexe et inclut des éléments cellulaires et acellulaires au sein d'une matrice extracellulaire (MEC), en présence d'une microvascularisation dédiée. Parmi les éléments cellulaires, les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont des acteurs majeurs de la régulation des CSH et sont essentielles au maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique au sein de ces niches. D'ailleurs, des données récentes suggèrent que des altérations des CSM, principal composant de la niche hématopoïétique, pourraient favoriser l'émergence d'hémopathies malignes. L'hématopoïèse peut être la cible d'événements oncogéniques aboutissant à l'apparition de pathologies tumorales, dites hémopathies malignes, pouvant affecter une ou plusieurs lignées hématopoïétiques, et qui se développent selon un mode chronique (sans blocage de la différenciation terminale) ou aigu (avec blocage de cette différenciation terminale). Les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des modèles de dysfonctionnement de l'hématopoïèse.

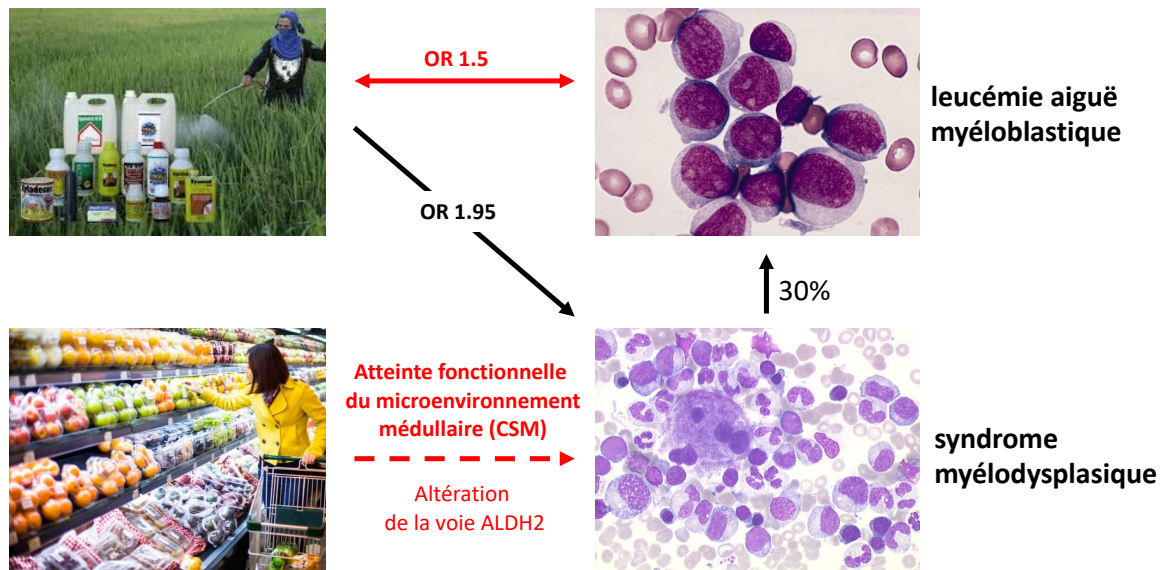
Depuis quelques années, il a été rapporté un intérêt des ALDH et notamment de l'ALDH1 dans l'exploration de l'hématopoïèse, notamment chez la souris. De plus en plus d'études rapportent également la pertinence de rechercher les cellules clonales exprimant un caractère souche (les cellules *ALDH^{high}*) afin de suivre ces cellules dans certaines hémopathies (leucémie aiguë, myélome etc.), prédictives de rechute.

L'exposition aux pesticides et son impact sur l'environnement et la santé humaine sont devenus aujourd'hui une problématique de santé publique. L'exposition professionnelle à de

fortes doses de pesticide est étudiée depuis plusieurs années. Alors que le risque d'hémopathies lymphoïdes après une exposition professionnelle a été clairement démontré depuis plusieurs années, le risque d'hémopathie myéloïde n'est pas clairement défini dans la littérature. Très récemment une méta-analyse a notamment mis en évidence un lien entre le risque de développer syndrome myélodysplasique et une exposition professionnelle aux pesticides. Concernant les LAM, les études montraient des résultats hétérogènes et nécessitaient une actualisation des données. La population générale est quant à elle quotidiennement exposée à de nombreux résidus de pesticides omniprésents dans l'environnement. La contamination peut se faire via l'alimentation, mais également via les eaux de boisson, lors des baignades dans des eaux contaminées et lors des manipulations à domicile de produits phytosanitaires. L'exposition est donc multiple et chronique tout au long de la vie des individus. Alors que l'on commence à identifier les effets individuels de chaque pesticide sur la santé humaine, les effets additifs et répétés de ces résidus de pesticides sur la population générale à long terme ne sont pas connus.

L'objectif central de cette thèse a été d'étudier le risque de développer une hémopathie myéloïde lors d'une exposition aux pesticides à fortes doses ou à très faibles doses. Le présent manuscrit détaille, en première partie, (i) les connaissances sur les CSM dans l'hématopoïèse normale et pathologique, (ii) l'implication des aldéhydes déshydrogénases dans l'hématopoïèse et enfin (iii) le lien entre le risque d'hémopathie après une exposition à fortes doses de pesticides, ou lors de l'exposition de la population générale aux pesticides à faibles doses. En seconde partie, il présente (i) les résultats obtenus lors de la réalisation d'une méta-analyse sur le risque de survenue d'une LAM après une exposition professionnelle aux pesticides et (ii) les résultats obtenus après une exposition de 21 jours à un cocktail de pesticides à faibles doses sur des CSM médullaires primaires. Des méthodes et résultats complémentaires seront également présentés, ciblant principalement les effets à faibles doses du manèbe et du mancozèbe sur les CSM. Enfin, nous présenterons une discussion générale sur l'ensemble des résultats, une conclusion et des perspectives.

Graphical abstract: Exposition aux pesticides et risque d'hémopathie myéloïde.



PARTIE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES

I. Les niches hématopoïétiques et leur microenvironnement

1) L'hématopoïèse et le concept de niche hématopoïétique

L'hématopoïèse se caractérise par l'ensemble des phénomènes nécessaires à la fabrication et au renouvellement continu des éléments figurés du sang. Avant la naissance l'hématopoïèse démarre transitoirement dans le sac vitellin, puis s'établit dans la région Aorte-Gonade-Mesonephros (AGM) intraembryonnaire après 6 à 8 semaines de gestation, et migre dans le foie fœtal et la rate, pour finir dans la moelle osseuse, seul compartiment hématopoïétique chez l'adulte. Elle prend place au niveau des niches hématopoïétiques présentes au sein du microenvironnement médullaire(1). Ce dernier est indispensable au soutien physique de l'hématopoïèse et à la régulation locale de la prolifération et de la différenciation des CSH. Les CSH sont des cellules dites « multipotentes » c'est-à-dire capables d'autorenouvellement mais aussi de différenciation dans toutes les lignées hématopoïétiques. C'est un mécanisme complexe, finement régulé qui permet une production constante de cellules selon les besoins de l'organisme.

L'hématopoïèse comprend l'érythropoïèse, la lymphopoïèse, la granulopoïèse, la monocytopoïèse et la thrombopoïèse, permettant la production respectivement des érythrocytes, des leucocytes (lymphocytes, granuleux et monocytes) et des plaquettes (Figure 1). Les cellules souches hématopoïétiques à court terme (ST-CSH) progressent en progéniteurs multipotents, qui ont un haut potentiel de prolifération mais qui perdent leur capacité d'autorenouvellement contrairement aux CSH. Plus récemment il a été montré que les progéniteurs multipotents représentaient une population encore hétérogène: malgré leur multipotence, une fraction de ces progéniteurs serait déjà engagée vers une voie de différenciation pré-établie (myéloïde ou lymphoïde). Il est ainsi suggéré que les différents progéniteurs multipotents seraient produits par différenciation des ST-CSH suivant le besoin hématopoïétique(2). Ce progéniteur multipotent peut ensuite s'engager dans le lignage myéloïde en générant un progéniteur myéloïde commun ou dans le lignage lymphoïde en générant un progéniteur lymphoïde commun, permettant la génération de toutes les cellules matures du système hématopoïétique.

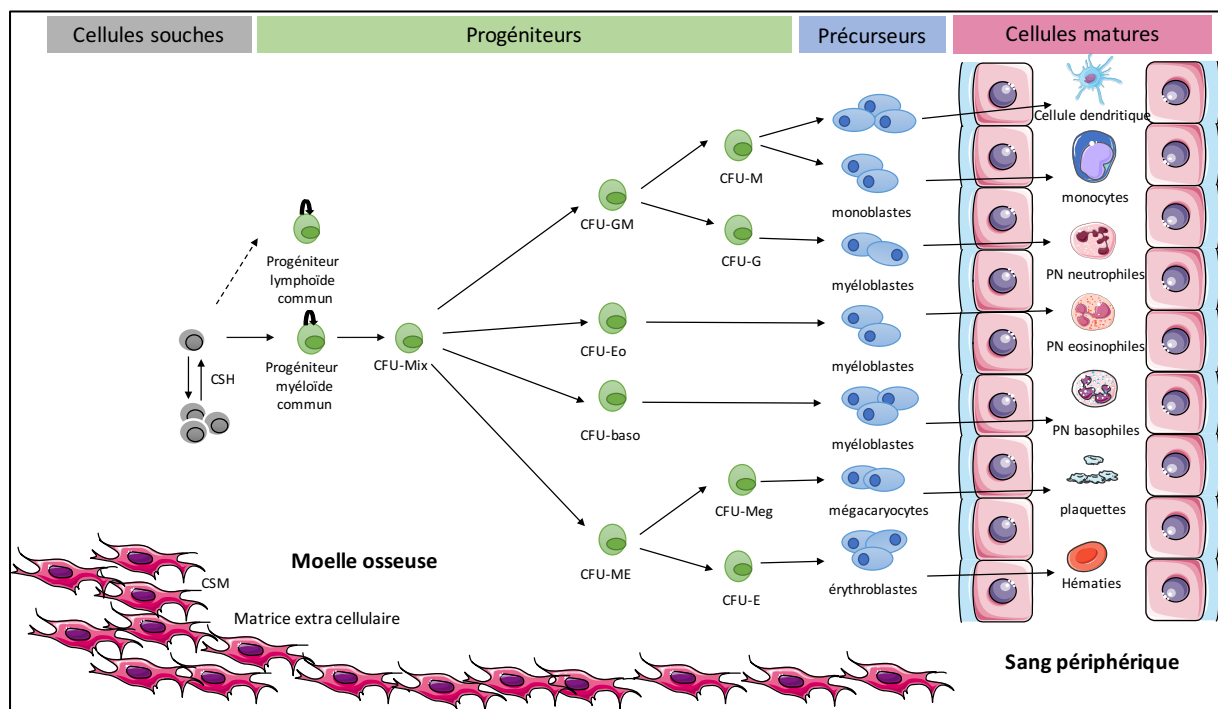


Figure 1 : Schéma illustratif de la différenciation hématopoïétique

(CFU-Meg : Unité formatrice de colonies mégacaryocytaire; CFU-GM : CFU granulomonocytaire; CFU-ME : CFU mégacaryocytaire-érythrocytaire; CFU-M: CFU monocytaire; CFU-G: CFU granulocytaire; CFU-E : CFU erythrocytaire; CFU-Eo: CFU éosinophile; CFU-Baso : CFU basophile).

Hématologie, Université & CHU de Tours

Plus récemment, les études convergent vers une redéfinition du modèle de l'hématopoïèse vers un système moins compartimenté. Les études sur les *Induced Pluripotent Stem Cells* (IPSC) ont permis d'élargir les connaissances notamment sur la plasticité cellulaire(3,4). Ainsi, il semblerait que le schéma de l'hématopoïèse le plus proche de la réalité serait davantage ressemblant à un modèle où les progéniteurs seraient dans un état transitoire, non stable, acquérant graduellement le phénotype d'engagement hématopoïétique d'un lignage donné. De ces observations, le modèle de Waddington (Figure 2) propose une représentation plus dynamique dans lequel la différenciation hématopoïétique vers une lignée donnée serait favorisée pour répondre à une situation pathologique de l'organisme (stress cellulaire, infections, cytopénies)(5–9).

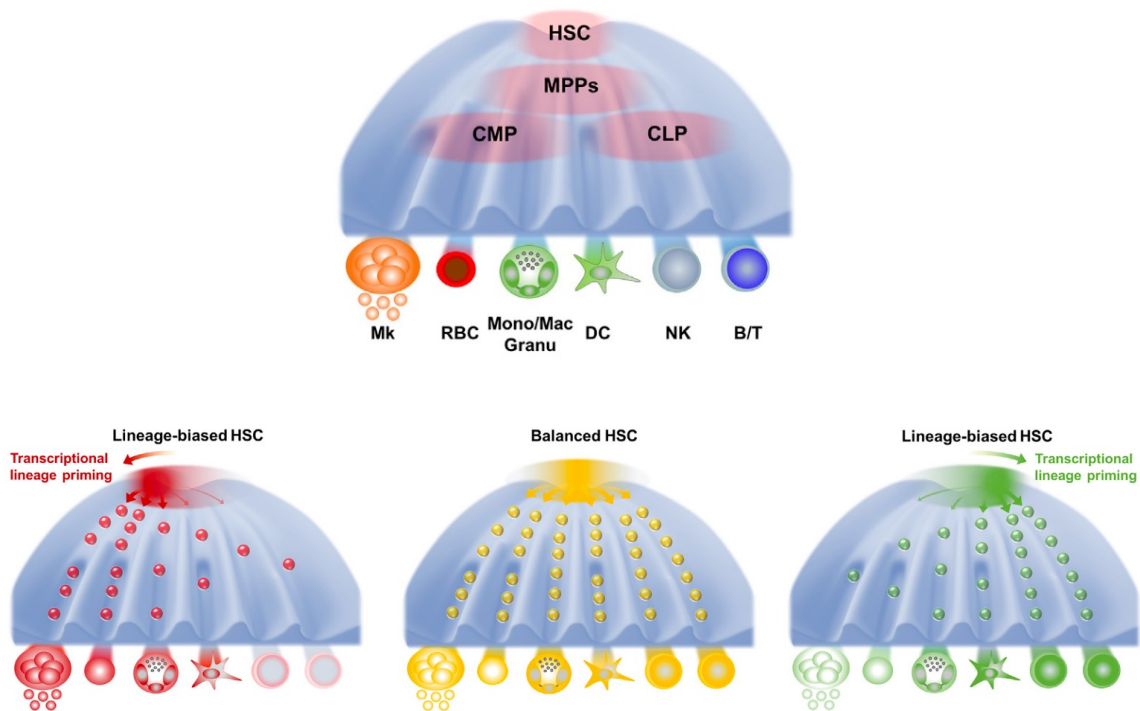


Figure 2 : Schéma illustratif d'un modèle d'hématopoïèse continu, dérivé du modèle de Waddington.

Les CSH acquerraient des caractéristiques spécifiques des lignages de façon continue et ne passeraient pas par des états intermédiaires stables. Dans ce modèle, les stades de développement en aval des CSH, ne représentent pas des types de cellules distincts, mais devraient plutôt être considérés comme des états transitoires dans le continuum des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques(10).

2) Les composants cellulaires de la niche hématopoïétique

a) *Le microenvironnement médullaire*

Le microenvironnement médullaire est principalement composé de cellules stromales mésenchymateuses qui sont des cellules multipotentes non hématopoïétiques présentes dans tous les tissus conjonctifs. Elles ont été décrites pour la première fois par Alexander Friedenstein qui a rapporté l'existence dans la moelle osseuse de progéniteurs capables de former des colonies allongées, adhérentes sur le plastique et d'apparence fibroblastique appelée CFU-F (Unité formatrice de colonies fibroblastiques). Ainsi, chaque colonie ensemencée chez des animaux syngéniques était capable de générer du tissu fibreux et de l'os(11). Plus tard, il a été suggéré l'existence de progéniteurs multipotents pour le tissu conjonctif et l'existence d'un microenvironnement pour les CSH circulantes(12). C'est dans les années 90 que Caplan a démontré que ces cellules étaient capables de donner de l'os, du stroma médullaire mais également du tissu cartilagineux, du tissu musculaire et des tendons.

Il a ainsi introduit pour la première fois le terme de « *mésenchymal stem cell* »(13). Enfin le comité *Mesenchymal and Tissue Stem Cell* de l'ISCT (*The international Society for Cellular Therapy*) a remplacé cette appellation par : cellules stromales mésenchymateuses multipotentes et a proposé des critères minimaux pour les définir comprenant :

- l'adhérence au plastique
- un phénotype qui se traduit par l'expression du CD105, CD73 et CD90 et l'absence du CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 et HLA-DR;
- un potentiel de différenciation en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro*

Au sein de la niche hématopoïétique, il existe d'autres cellules stromales qui n'ont pas une origine hématopoïétique. On peut ainsi citer les ostéoblastes, les adipocytes, les cellules vasculaires lisses.

- les ostéoblastes sont des cellules ostéoformatrices qui se trouvent en contact de l'endoste. Ils dérivent des CSM et jouent un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la quiescence des CSH(14). Ils ont également un rôle dans la mobilisation des CSH(15)
- les adipocytes sont les cellules les plus abondantes du stroma médullaire(16), ils représentent une réserve énergétique indispensable à l'hématopoïèse(17). Ils synthétisent un certain nombre de molécules telles que l'adiponectine qui joue un rôle dans l'hématopoïèse et des prostaglandines pourraient avoir une influence négative sur les CSH en induisant leur apoptose(18). Les adipocytes ont donc un rôle de régulateurs négatifs de l'hématopoïèse. Ainsi, il a été démontré qu'une inhibition de l'adipogenèse après irradiation permettait une reconstitution rapide de l'hématopoïèse(19)
- les cellules musculaires lisses sont responsables de la synthèse de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire.
- la matrice extracellulaire est composée de diverses protéines (glycoprotéine, protéoglycane, collagène) indispensables au maintien et au soutien de l'hématopoïèse.
- les cellules endothéliales présentent au sein de la paroi interne des vaisseaux

sanguins. Il a été démontré que ces cellules sécrètent un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance indispensables à la différenciation et à l'expansion des CSH *in vitro*(20)

b) Les cellules hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques permettent la formation de progéniteurs puis de précurseurs et enfin de cellules matures, représentant les éléments fonctionnels figurés du sang. Elles se caractérisent par leur propriété d'autorenouvellement et de multipotence(21). Les CSH sont également capables de migrer sous l'action de facteurs moléculaires de la niche vers des sites extramédullaires (migration) ou de retourner vers des sites intramédullaires (*homing*), (Figure 3).

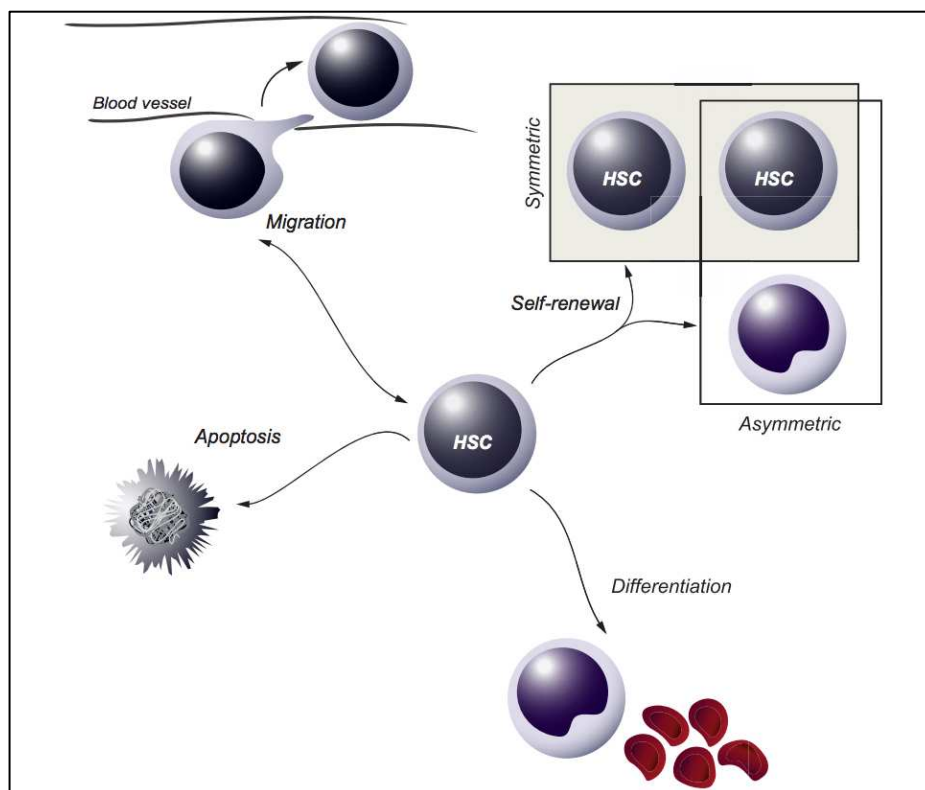


Figure 3 : Devenir des CSH

Après division cellulaire les CSH peuvent soit s'autorenouveler afin d'assurer une réserve constante de CSH indispensable à l'hématopoïèse, soit se différencier en éléments matures du sang, soit migrer ou bien entrer en apoptose(22)

Il existe d'autres cellules d'origine hématopoïétique présentes au sein de la niche :

- les ostéoclastes, issus de la différenciation des macrophages, sont associés aux ostéoblastes au niveau de l'endoste et permettent la résorption et le remodelage

du tissu osseux. Il a été montré que ces cellules jouaient un rôle dans le maintien des CSH dans la moelle osseuse(23).

Dans ce contexte, plusieurs types de niches ont été décrites selon le type de CSM, de cellules endothéliales et de cellules hématopoïétiques qui les composent(24) (Figure 4) :

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

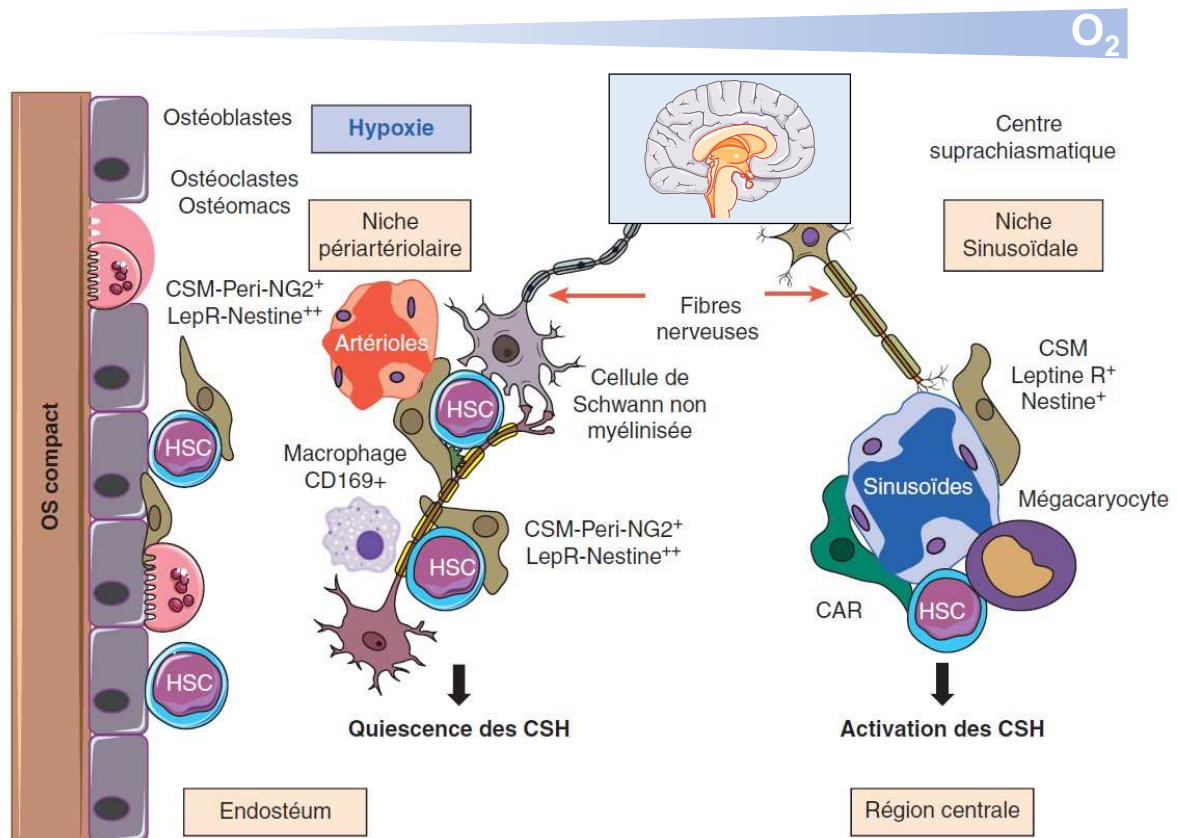


Figure 4 : Organisation cellulaire de la moelle osseuse hématopoïétique(25).

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

3) Anomalies génétiques et moléculaires des CSM dans les SMD et les LAM

Il est désormais bien établi que la régulation des CSH et du processus d'hématopoïèse est assurée par des interactions complexes avec le microenvironnement médullaire. Au fil des années, la physiopathologie des hémopathies a été progressivement élucidée : des anomalies cytogénétiques puis moléculaires ont ainsi été reliées à l'apparition de ces maladies. Le microenvironnement, initialement peu pris en compte, a gagné en intérêt au fur et à mesure que des travaux ont montré ses altérations au cours des hémopathies, ainsi que son rôle dans leur apparition et leur progression.

Flores-Figueroa *et al.* ont étudié des CSM provenant de patients atteints de SMD(26). Il a ainsi été montré que les CSM n'étaient pas moins nombreuses dans la moelle osseuse des patients ayant un SMD mais qu'elles présentaient des altérations en culture : (i) difficulté à atteindre la confluence, (ii) prolifération plus lente. Au niveau moléculaire, il a été rapporté une surexpression (environ 10 fois) du gène *CDKN2B*, codant pour un inhibiteur de kinase dépendante de la cycline B, dans les CSM de SMD(27). Cette surexpression pourrait être responsable d'une inhibition du cycle cellulaire et ainsi expliquer le défaut prolifératif observé chez ces CSM. Concernant le défaut prolifératif retrouvé, il a précisément été étudié par Aanei *et al.*(28), les CSM de SMD présentaient un défaut de prolifération associé à une faible capacité clonogénique, potentiellement reliée à une incapacité à réaliser des divisions asymétriques.

Concernant les anomalies cytogénétiques, plusieurs études rapportent des aberrations génétiques dans les CSM des patients ayant un SMD, avec principalement une perte de matériel chromomique(26) ou des translocations(29). Ces anomalies sont classiquement différentes de celles retrouvées dans les cellules hématopoïétiques, et leur acquisition dans le temps est encore controversée.

Outre les anomalies cytogénétiques, des anomalies épigénétiques ont également été mises en évidence, et notamment une hyperméthylation de l'ADN des CSM médullaires issus de patients avec un SMD(27). Certains gènes sont ainsi hyperméthylés dans leur région promotrice telles que *HOXB1* et *TBX15*(30), associée à une régulation négative des ARNm *HOXB1* et *TBX15*. D'autre part, il a été décrit une hyperméthylation du corps du gène *PITX2*, entraînant une surexpression significative de l'ARNm de *PITX2* dans les CSM dérivées de

SMD(30). Enfin, les mutations épigénétiques de ces CSM semblent plus fréquentes dans les SMD à haut risque que dans les SMD à faible risque(31).

De nombreuses études mettent en évidence des différences de transcriptome dans les CSM de SMD par rapport aux CSM témoins. À titre d'exemple, Medyouf *et al.* ont rapporté que 1008 gènes sont exprimés de manière différentielle dans les CSM des patients avec un SMD *versus* les CSM témoins(32). Ces gènes sont connus pour être impliqués dans l'activation stromale, la réponse inflammatoire, l'adhésion cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire et les interactions cytokine-récepteur.

Des altérations de différentes voies de signalisation ont été rapportées. Il a ainsi été décrit des anomalies de la voie Notch dans les CSM de SMD(33). Jagged1, un bon marqueur de cette voie, a d'ailleurs été décrit comme surexprimé (qPCR et cytométrie en flux) dans ces cellules(30). De plus, la surexpression de Jagged1 est associée à une diminution de la capacité à former des aires de Cobblestone à partir de cellules CD34⁺ co-cultivées avec des CSM de patients atteints d'un SMD(34), montrant un défaut de leur capacité à soutenir l'hématopoïèse. L'activation de la voie p53/p21, bien connue dans la pathogenèse du cancer en raison de son rôle dans l'inhibition du cycle cellulaire et de l'apoptose(35), participerait à l'augmentation de la sénescence des CSM de SMD. Plus largement, plusieurs voies de signalisation altérées semblent être liées à la sénescence de ces cellules. Par exemple, 4 des 84 gènes appartenant à la voie PI3K/AKT, régulant la survie cellulaire et la prolifération, ont été montrés comme considérablement régulés à la baisse(36). Un autre exemple est la signalisation WNT, voie comprenant (i) la signalisation canonique, impliquée dans l'auto-renouvellement et le maintien à l'état souche des cellules et (ii) la signalisation non canonique impliquée dans l'inhibition de la prolifération(37). L'activation de la voie non canonique(31,37) associée à la baisse de l'activité de la voie canonique(36) peuvent expliquer la baisse de la prolifération des CSM de patients ayant un SMD. La diminution de l'activité de la voie canonique peut s'expliquer, en partie, par l'augmentation de l'expression des protéines DKK1 et DKK2, deux inhibiteurs de cette voie de signalisation(33). De plus, des dérégulations épigénétiques de *FRZB*, un antagoniste de la voie de signalisation WNT ont été décrites dans les cellules stromales de SMD(33). Enfin, des anomalies dans la signalisation de l'inflammation tels que

NF- κ B, EGF, TGF- β et TNF- α ont été rapportées(38,39). L'activation de NF- κ B a notamment été décrite comme un régulateur négatif de l'hématopoïèse(40).

Les CSM de SMD sont connues pour avoir un potentiel de différenciation ostéogénique altéré. Au niveau moléculaire, *osterix* (un facteur de transcription impliqué dans la différenciation précoce des ostéoblastes), l'*ostéocalcine* (exprimée par les ostéoblastes matures) et *RUNX2* (un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des ostéoblastes) sont régulés à la baisse dans les BM-MSC de MDS(30,31,41). D'autre part, il a été rapporté une surexpression de l'ostéopontine(30), une glycoprotéine particulièrement importante pour l'ancrage des ostéoblastes à l'os(42). D'autre part, l'expression d'*IL8*, nécessaire à la différenciation ostéogénique(43), est réduite dans les cellules stromales de MDS(31). Par la suite des études ont montré des caractéristiques de SMD apparaissant chez des souris pour lesquelles le gène *dicer1* avait été invalidé(44). Suite à cette étude de Raaijmakers *et al.*, des études ont été menées sur *DICER1* dans les cellules stromales humaines et la diminution de son expression a été associée à de la sénescence, une baisse de la capacité de différenciation et une baisse de la capacité de soutien de l'hématopoïèse(30,45,46). Il a également été rapporté une sous-expression de *DROSHA*. De manière intéressante, *DICER1* et *DROSHA* sont tous deux des gènes liés à la voie des microARN, qui a été montrée comme altérée dans les CSM de SMD *versus* les CSM témoins, (moins d'expression de micro-ARN-155 (miR-155), miR-181a et miR-222)(46,47). Un autre acteur clé de la différenciation ostéogénique des CSM médullaires est une protéine de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline 2 (IGFBP2)(48). L'expression de l'IGFBP2 est réduite(32), pouvant s'expliquer par un mécanisme épigénétique dû à des anomalies de méthylation(31). Enfin, la signalisation du TGF- β et par conséquent l'expression du gène *TGFB1* est essentielle au remodelage osseux et à l'ostéogénèse(49). Dans une étude menée par Geyh *et al.*, il a été établi que le TGF- β 1 entraînait une inhibition fonctionnelle des cellules stromales dans les SMD(50).

Concernant le métabolisme des CSM de SMD, lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*, dans des conditions de normoxie, elles maintiennent une signature de type hypoxique(32). Medyouf *et al.* montrent ainsi un enrichissement des gènes en lien avec l'hypoxie(32). Un autre changement métabolique dans ces cellules peut être lié au fer puisqu'une augmentation de l'apoptose et du niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été rapportés dans des

SMD surchargés en fer(51). Il a également été rapporté que certains gènes, impliqués dans le transport du fer, tels que *DMT1* et *ZIP14* étaient surexprimés dans les CSM de SMD(52).

Des altérations de l'interactome au sein de la niche hématopoïétique ont également été décrites. En utilisant la stratégie RNA seq dans des CSM de SMD, il a été rapporté une signature cytokinique plutôt pro-inflammatoire(39,53), avec notamment une surexpression d'interleukine 6 (*IL6*)(54). Le stem cell factor (SCF), un facteur de croissance hématopoïétique clé pour favoriser l'auto-renouvellement des *Hematopoietic stem and progenitor cells* (HSPC) primitives est quant à lui sous-exprimé dans le stroma des SMD(30). De même, *ANGPT1* et *VEGFA*, deux gènes impliqués dans l'angiogenèse sont également sous-exprimés(30,33) contrairement à la cytokine *Leukemia inhibitory factor* (LIF), qui est sur-exprimée dans les CSM de SMD(32), responsable d'une augmentation du potentiel angiogénique(55). Les molécules d'adhésion sont cruciales dans les interactions entre les CSM médullaires et les HSPC dans la niche hématopoïétique(56). Il a d'ailleurs été rapporté une augmentation de l'expression de la N-cadhérine dans CSM de SMD(32). Par ailleurs, Flores-Figueroa *et al.* ont rapporté que ces CSM semblent plus immunoréactives pour différentes molécules d'adhésion comme l'intégrine 1 β (CD29) ou HCAM (CD44), même si aucune différence significative n'a été montrée(57).

Concernant les LAM, plusieurs études ont également rapporté des anomalies des CSM, notamment en termes de morphologie, de différenciation et d'expression de marqueurs moléculaires. Ainsi, une étude de 2014(58) montre des anomalies morphologiques des CSM de LAM. De même, ils constatent que la différenciation adipocytaire et ostéoblastique induite est possible, mais que les CSM de LAM présentent des signes de prédifférenciation adipocytaire et sous expriment la E-cadhérine alors que les ostéoblastes de LAM la surexpriment. Cette molécule est essentielle dans les liaisons entre les cellules stromales et les CSH. Par la suite, Chandran *et al.*(59) ont étudié leur capacité proliférative, leur capacité de soutien des progéniteurs hématopoïétiques et l'expression génique associée. Ils ont montré que la prolifération des CSM de LAM était très variable avec des morphologies souvent altérées et une survie cellulaire impactée. Les auteurs ont également montré des défauts de soutien de l'hématopoïèse, reliant cette observation à la surexpression de gènes favorisant la quiescence des CSH tels que *ANGPT1* (angiopoïétine) et *OPN* (ostéopontine). De même, des

observations similaires ont été mises en évidence par une autre équipe cette même année, montrant que les CSM de LAM étaient caractérisées par un phénotype de CSM immatures (CD146+/CD166-), avec une très forte proportion de cellules en phase G0 du cycle cellulaire, un pourcentage de cellules sénescents important et une capacité clonogénique réduite(60).

Ces travaux convergent donc sur l'existence d'altérations des CSM au cours des SMD/LAM, et cela coïncide avec une perte de la capacité à maintenir une hématopoïèse physiologique dans ces pathologies. Le microenvironnement joue donc un rôle majeur dans le développement de ces hémopathies. Ceci explique pourquoi nous nous intéresserons au cours de notre travail expérimental à l'impact d'une exposition aux pesticides sur le microenvironnement médullaire et plus particulièrement aux modifications induites par cette exposition sur les CSM primaires médullaires.

II. Le rôle des ALDH dans l'hématopoïèse et les hémopathies.

Les cellules ALDH^{High} de la moelle osseuse ou du sang de cordon représentent environ 1% des cellules mononucléées(61), elles sont 10 fois moins nombreuses dans le sang périphérique non mobilisé. Ces cellules ALDH^{High} présentent des capacités fonctionnelles semblables aux CSH. La voie de l'acide rétinoïque, impliquant principalement ALDH1 est très importante pour la différenciation des cellules hématopoïétiques(62).

L'environnement tumoral est composé de cellules hétérogènes dans lesquelles une petite population de cellules est capable d'augmenter ses capacités d'autorenouvellement, d'initiation de tumeur, de propagation, de résistance au traitement et de récurrence à la maladie, appelées les cellules souches cancéreuses (CSC). Certaines ont une ou plusieurs activités ALDH(63) qui leur permettent de résister à certains traitements anticancéreux. L'activité ALDH a donc été décrite comme un marqueur fiable, indicatif, de la présence de CSC. Dans certains cas, l'activité de certaines isoenzymes pourrait donc être utilisée comme un marqueur pronostique(64).

Nous avons donc réalisé une revue de la littérature, faisant un état des connaissances sur la famille enzymatique des ALDH en hématologie. Nous avons ainsi rapporté que certaines ALDH pouvaient être utilisées comme biomarqueurs en hématologie, et plus particulièrement dans l'hématopoïèse normale et leucémique. Puis nous nous sommes plus particulièrement intéressés au polymorphisme du gène *ALDH2*. En effet, la littérature converge sur le fait que ce polymorphisme est impliqué dans certaines maladies hématologiques congénitales ou acquises. Cette revue de la littérature vient d'être soumise.

ALDH enzymes and hematologic diseases

Amélie Foucault,^{1,2} Olivier Hérault^{1,2,3,4,5}

¹ Tours University Hospital, Department of Biological Hematology, Tours, France

² CNRS ERL7001 LNOX, EA 7501, Tours University, Tours, France

³ CNRS GDR 3697 Micronit “Microenvironment of tumor niches”

⁴ Canceropole Grand Ouest (CGO), NET “Niches and epigenetics of tumors” network,
Nantes, France.

⁵ OPALE Carnot Institute, The Organization for Partnerships in Leukemia, Hôpital Saint-
Louis, Paris, France

Contact information for correspondence: Pr. Olivier Hérault, MD-PhD, Service
d’hématologie biologique, CHU, Tours, 37000, France. E-mail address:
olivier.herault@univ-tours.fr. Phone: +33 2 4747 4721 / Fax: +33 2 4747 6934

Abstract

Aldehyde dehydrogenases (ALDH) are a group of enzymes that catalyze the oxidation of aldehydes to carboxylic acids. The human ALDH superfamily including 19 isozymes plays key physiological and toxicological functions. This review presents the current knowledge on ALDH, and more particularly on ALDH2 in congenital and acquired hemopathies. It also describes the possibilities of using ALDH as a biomarker and as a therapeutic target to identify and eradicate leukemic stem cells.

Introduction

The aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene superfamily encodes enzymes involved in detoxification of endogenous and exogenous aldehyde substrates.[1] There are 19 human *ALDH*-related genes with different tissue expression and substrate specificity (Table 1).[2] Multiple functions of ALDH enzymes were described: catalytic properties and non-catalytic interactions with endogenous compounds and exogenous agents.[1,3] The endogenous aldehydes are produced by the metabolism of amino acids, carbohydrates, lipids, biogenic amines, vitamins, and steroids.[3] Furthermore, polymorphisms of human *ALDH* genes are frequently associated with metabolic disorders.[4] As example, polymorphism in *ALDH2* is associated with altered acetaldehyde metabolism,[4] increasing risk of oropharyngolaryngeal cancer[5,6] or esophageal cancer.[5,7] Moreover, loss of enzymatic activity induced by a polymorphism in *ALDH3A2* is described in the Sjögren-Larsson syndrome.[4,8,9]

The best documented enzyme in ALDH family as having an impact in hematology is ALDH2. This enzyme, known to be mainly located in the mitochondria is encoded in human by a nuclear gene located at chromosome 12q24[10]. It's expression is ubiquitous but with higher abundance in the liver.[11] It's role in alcohol metabolism is well described. In human, the ethanol catabolism occurs in the liver, catalyzed by alcohol dehydrogenase (ADH) which transforms ethanol into acetaldehyde, and by ALDH2 enzyme which transforms acetaldehyde in acetate[2] thus providing an essential protective enzymatic function against toxic agents. Moreover, other catalytic actions have been described. As example, ischemia and reperfusion produce reactive oxygen species (ROS) which induce lipid peroxidation with an increase of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA) production. It has

been reported that activation of ALDH2 reduces neurological impairments in rats, indicating potential implication of ALDH2 in 4-HNE degradation.[12]

ALDH2 is crucial in the detoxification of aldehydes.[13] Genetic polymorphisms of human *ALDH2* have been described.[14,15] The ALDH2*2 variant allele, which produces an ALDH2 protein with E487K mutation, is the most frequent *ALDH2* variant, found in 35-45% of East Asian people.[14,16] This polymorphism induces a lower ALDH2 enzymatic activity and impairs alcohol metabolism after consumption of alcoholic beverages. It has been described that *ALDH2* polymorphism can be involve in neurodegenerative diseases, notably in Alzheimer's disease,[17,18] in heart failure[19] and the overall cancer risk in Asian population.[20,21] Transgenic mice with *aldh2* deficiency were generated to recapitulate the phenotype of this punctual mutation: (i) *aldh2* knockout induces hypersensitivity to ethanol, acetaldehyde accumulation and disturbance of oxidative metabolism[22] (ii) *aldh2*^{E487K} knock-in mice induces a lower enzymatic ALDH2 activity, higher acetaldehyde level after ethanol consumption and increased ROS production after chemotherapy treatment.[23]

In this review, we focused on ALDH, and more particularly on ALDH2, in hematopoiesis and hematological diseases.

ALDH activity as a biomarker in hematology

Physiological hematopoiesis

Numerous studies established that ALDH is as an interesting marker for the identification and quantification of human HSCs and is involved in the biology of these cells.

It has been reported that hematopoietic stem cells (HSCs) present a higher ALDH1 immunoreactivity than other hematopoietic primitive cells,[24] suggesting a potential role of this enzyme in HSC maintenance. The ALDH1 immunoreactivity was reported as useful to identify and isolate human HSCs,[24–26] classically performed in viable cells by flow cytometry assay using a fluorescent substrate.[27] Stroms *et al.* published an efficient strategy to isolate primitive HSCs using BODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA), a fluorescent non-toxic substrate for ALDH, which freely diffuses into intact and viable cells.[25] In the presence of ALDH, BAAA is converted into BODIPY-aminoacetate (BAA), a negatively charged product that is retained inside the cells. Intracellular accumulation of BAA leads to increased fluorescence, and these ALDH-bright cells can be analyzed with flow cytometry.[28] However, some studies reported that this assay was inappropriate for identifying murine HSCs.[29,30] ALDH1A1 and ALDH3A1 enzymes were identified to play an important role in the capacity of maintenance, differentiation and expansion of normal HSCs.[28,31,32] *Aldh1a1*^{-/-} mice fail to showed fetal defects in HSCs,[33] but a double invalidation of *aldh1a1* and *aldh3a1* in mice induces a decrease in HSC number in newborn.[34] Another study shown the involvement of Aldh16a1 enzyme in the initiation and/or the maintenance of primitive erythropoiesis in zebrafish embryos.[35] ALDH has also a precise function in regulating the differentiation of HSCs. Irreversible inhibition of ALDH1A2 and ALDH2 enzymes using N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB)[36] delayed the differentiation of human HSCs *via* a decrease in retinoic acid receptor-mediated signaling.[28,32]

The identification of HSCs with BAAA staining was also used in the process of HSC transplantation by characterizing HSC graft quality with ALDH activity.[37] In this study, Lioznov *et al.* suggested that quantification of ALDH activity in allogeneic HSC grafts could be a marker for HSC activity since they observed that patients who received a low quantity

of ALDH^{bright} cells presented a loss of CFU-GM potential and delayed establishment of full hematopoietic donor cell chimerism. Moreover, Fallon *et al.* reported that ALDH^{bright} cell population in peripheral blood (PB) mobilized progenitors was enriched of cells with immature phenotypes able to generate long-term culture (LTC)-derived CFU, expand in primary and secondary LTC, and generate multiple cell lineages.[38] Interestingly, they also reported that when autologous PB HSC transplantation in patients, the number of infused ALDH^{bright} cells was highly correlated with the time to neutrophil and platelet engraftment.[38]

Malignant hematopoiesis

Acute myeloid leukemias (AML) are hematopoietic malignancy characterized by an aberrant clonal expansion resulting in massive infiltration of bone marrow by immature leucoblasts. In 1994, leukemic cells able to initiate the hematopoietic malignancy were identified and named “leukemic-initiating cells”(LICs)[39] and currently named “leukemic stem cells” (LSCs).[40] As known for normal HSCs, this fraction of AML cells expresses CD34 but not CD38 antigens, generates leukemia after transplantation in immunodeficient mice[39,40] and present a hierarchy of distinct LSCs classes with decreasing self-renewal ability.[41] It has also been reported that LSCs might be CD34⁻. [42,43] LSCs are quiescent, explaining the complexity to eradicate these cells with standard therapies which classically target proliferating cells,[44] thus explaining the relapse of AML patients.[45] In order to estimate LSCs burden and eradicate these cells, specific markers to target them are required.

CD34⁺CD38⁻ HSCs and LSCs present high levels of ALDH activity.[46,47] This enzymatic activity could participate to the drug resistance since it was reported that the transduction of human leukemic cells with lentiviral vectors encoding *ALDH1A2* or *ALDH2* increased resistance to doxorubicin and 4-hydroxycyclophosphamide.[48] Interestingly,

a common feature of LSCs is a lower ALDH activity than normal CD34⁺CD38⁻ HSCs that co-exist with these LSCs in the AML bone marrow.[47] Since surface markers are missing to identify LSCs,[46] it had been proposed that ALDH activity could be used as a marker to follow the prognosis and the residual disease.[49,50]

ALDH activity was proposed to be used as a biomarker in lymphoproliferative disorders. In chronic lymphocytic leukemia (CLL), a study evaluated whether increased ALDH activity was associated with more aggressive disease.[51] It was compared with two other CLL biomarkers used as prognosis markers (immunoglobulin heavy chain variable gene (IgHV) mutation status and *ZAP-70* expression) and an increased ALDH activity was observed in high-risk CLL patients. In concordance with this study, high ALDH1A1 expression was associated with poor prognosis in patients suffering from B-cell non-Hodgkin's lymphoma.[52] Finally, regarding multiple myeloma (MM), an increased ALDH1 activity has been found in human multiple myeloma drug resistant progenitors.[53–55]

Deregulation of ALDH activity and pathophysiology of hematological diseases

While high *ALDH1* expression is well known to characterize immature progenitor cells in blood cancers (AML, CLL, MM), the differential expression of other *ALDH* isoforms is poorly described in blood malignancies (Table 1). The team of Spiegelman reported that Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) affects proliferation and tumorigenic potential of leukemia cells through regulation of expression of the aldehyde dehydrogenase, ALDH1A1.[56] *ALDH1A2* has been found aberrantly expressed in more than 50% of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cases.[57] Moreover, ALDH1A2 expression confers resistance to Aracytine in K562 leukemia cells and is increased after the appearance of Aracytine resistance in clinical cases.[58] In mouse model, *Aldh3a2* has been identified as

critical in protecting LSCs from oxidative cell death.[59] Finally, the bone marrow microenvironment could participate in the regulation of ALDH expression in leukemic cells since it has been shown that among the 19 ALDH isoforms, ALDH1L2 and ALDH2 enzymes were significantly upregulated in human AML cells co-cultured with BM-mesenchymal stem/stromal cells (BM-MSCs) compared to cells cultured alone.[60] In a recent study, our team observed that human normal BM-MSCs exposed to low doses of pesticides present decreased ALDH2 activity associated with accumulation of acetaldehyde, DNA damages and decreased capacity to support primitive hematopoiesis. Interestingly, the same abnormalities were found in primary BM-MSCs of patients suffering from myelodysplastic syndrome (MDS), a pre-leukemic myeloid disease occurring in elderly (older than 55 years),[61] suggesting that ALDH2 deficiency in BM microenvironment may participate in the pathophysiology of MDS.[61]

To try to combat the LSC population selectively, ALDH inhibitors were evaluated. It has been reported that disulfiram (DSF) selectively eradicated LSCs in AML. This molecule is involved in cytotoxicity, involving the induction of stress-related ROS-JNK pathway and the inhibition of Nrf2 and nuclear factor κ B pathways.[62,63] Another ALDH1 and ALDH3 inhibitor, dimethyl ampal thiolester (DIMATE) showed selective toxicity against LSCs without effects on normal HSCs.[28,64], and promoted synergistic response with cytarabine.[65]

ALDH2 polymorphisms

ALDH2 human gene is located on 12q24.12, and it is interesting to note that abnormalities of chromosome 12q24 (addition, translocation, deletion) were widely described in myeloid disorders such as AML,[66–69] chronic myeloid leukemia,[70,71] polycythemia vera and myelofibrosis,[72] and myelodysplastic syndrome[73,74].

ALDH2 is the single most gene with the greatest number of human genetic polymorphism. One of them was described in hematological diseases, and also in various cancers: rs671 mutation also named Glu487Lys, or Glu504Lys, or E504K and designated *ALDH2**2.[20] This allele encodes a protein with decreased ALDH2 activity.[75] Interestingly, ALDH2 is involved in aging process,[76,77] and notably *ALDH2**2 allele. It was shown that transgenic mice overexpressing *ALDH2**2 had a significant decrease in median life (96 weeks) compared with control mice (126 weeks).[78] This allele is frequently found in East Asian populations (around 40% of the population),[79,80] and a study including 2.200 Japan subjects showed that *ALDH2**2 homozygous genotype was significantly reduced in females in 60–70s age group compared to 40–50s group.[81]

ALDH2 detoxifies endogenous aldehydes, which are the major source of DNA damage repaired by the Fanconi anemia (FA) pathway. FA is a rare autosomal recessive disorder associated with a genomic instability syndrome and characterized by bone marrow failure (BMF), congenital abnormalities and cancer predisposition (in particular MDS, AML and solid tumors).[82–84] The *ALDH2**2 allele has been associated with faster progression to BMF in children suffering of FA.[85,86] In ALDH2 deficient patients, HSCs accumulate DNA damages when the both FA and DNA repair pathway are altered, causing BMF, mediated by p53/p21 signaling in cell death or senescence.[87] In Japanese children with FA, homozygous wild-type *ALDH2* allele develop aplastic anemia with a median time estimated at 72 months, at 28 months in heterozygous *ALDH2/ALDH2**2 and between 0 and 7 months in homozygous *ALDH2**2.[85] During pregnancy, both mother and embryo produce endogenous aldehydes which can damage DNA. Maternal and embryonic ALDH2 are essential to repair DNA damages, specifically in *FANCA*-deficient embryos.[88–90] This fetal aldehyde catabolism is essential for the bone marrow hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) preservation *in utero*. [90] It has been reported in mice, that

Aldh2^{-/-}/*Fanca*^{-/-} embryo transfer in wild type mice avoid lethality but not HSPCs abundance.[90] Nevertheless, newborn presents bone marrow failure inducing death in less than 3 weeks.[90]

A recent article published in 2020, reported for the first time 10 cases of AMED syndrome (AMEDS). Patients are characterized by aplastic anemia, mental retardation, short stature and microcephaly.[91] Moreover, all patients developed myelodysplastic syndrome during infancy or childhood.[91] Authors showed that *ALDH2**2 polymorphism and the biallelic mutations in *ADH5* were essential for the AMEDS development.[91] *ALDH2* and *ADH5* are two detoxifying enzymes and are essential in the formaldehyde clearance. In case of deficiency of this two enzymes, formaldehyde accumulates in cells leading genome instability, underlying hematopoietic failure and leukemia.[92] Concomitantly, it is also reported that *ALDH2**2 defective allele is involved in the severity of clinical expression of AMEDS.[91]

The impact of this *ALDH2* polymorphism (rs671, c.1510G>A) was also studied in idiopathic aplastic anemia, another syndrome of BMF. AA homozygotes show very low catalysis of aldehydes, and GA heterozygotes display strongly reduced catalysis compared with GG homozygotes. By studying 79 Japanese children (40 GG, 29 GA, 10 AA) aged ≤15 years with aplastic anemia, it was observed that patients with AA genotype were significantly younger at diagnosis than GG or GA patients, without difference in the severity of the disease. Moreover, the failure-free survival rate at 10 years was significantly decreased in the GA/AA group of patients.[93]

Finally, the effect of *ALDH2**2 allele was studied on clinical states of patients suffering from Diamond-Blackfan anemia (DBA), a very rare constitutional ribosomopathy inducing congenital anomalies, BMF and cancer predisposition. This disease is caused by alterations in ribosomal proteins encoding genes involved in erythropoiesis, notably *RPS19*

(19q13),[94,95] and there is a high rate of apoptosis in erythroid progenitors and precursors.[96–98]. In the first year of life, biological features of DBA are a normochromic macrocytic anemia and a reticulocytopenia associated with a decrease of erythroid precursors in the bone marrow.[99] Ikeda *et al.* studied a cohort of 113 DBA Japan patients, 75 presenting heterozygous mutations or deletions in ribosomal protein genes, and it was not detected any difference in DBA patients with *ALDH2* polymorphism in age at onset, malformations or reactivity to corticosteroid.[100]

Very recently, new *ALDH2* variants decreasing ALDH2 functionality and inducing an accumulating of toxic acetaldehyde in cell were reported among African (I41V mutation and *ALDH2**3 designation), Latino (P92T mutation and *ALDH2**4 designation or V304 mutation and *ALDH2**6 designation), South Asian (T244M mutation and *ALDH2**5 designation), and Finnish (R338W mutation and *ALDH2**7 designation) ethnic populations.[101] The medical consequences of these variants were not reported to date.

Conclusion

ALDH isozymes are involved in physiologically and toxicologically critical roles. This review highlights the key role of ALDH enzymes in hematologic diseases. The deficit of ALDH2 activity contributes to the severity of congenital BMF syndromes. Conversely the high activity level of ALDH in LSCs from leukemic BM may help to identify these cells in flow cytometry assays. It also opens up interesting therapeutic prospects for pharmacological inhibition of these enzymes in order to eradicate these LSCs responsible for relapses which are the seriousness of these leukemia.

References

- 1 Vasiliou V, Nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2005;2:138.
- 2 Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, et al. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev* 2014;94:1–34.
- 3 Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* 2000;129:1–19.
- 4 Vasiliou V, Pappa A. Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. *Pharmacology* 2000;61:192–198.
- 5 Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, et al. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 1998;19:1383–1387.
- 6 Nomura T, Noma H, Shibahara T, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M 1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol* 2000;36:42–46.
- 7 Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, et al. Esophageal cancer and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:99–102.
- 8 Rizzo WB, Dammann AL, Craft DA. Sjögren-Larsson syndrome. Impaired fatty alcohol oxidation in cultured fibroblasts due to deficient fatty alcohol: nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase activity. *J Clin Invest* 1988;81:738–744.
- 9 Rizzo WB, Craft DA. Sjögren-Larsson syndrome. Deficient activity of the fatty aldehyde dehydrogenase component of fatty alcohol: NAD⁺ oxidoreductase in cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1991;88:1643–1648.
- 10 Raghunathan L, Hsu LC, Klisak I, et al. Regional localization of the human genes for aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase-2. *Genomics* 1988;2:267–269.
- 11 Oyama, Tsunehiro. Tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the ALDH2 gene-disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. *Front Biosci* 2005;10:951.
- 12 Li Y, Liu S, Qi S. ALDH2 Protects against ischemic stroke in rats by facilitating 4-HNE clearance and AQP4 down-regulation. *Neurochem Res* 2018;43:1339–1347.
- 13 Kimura M, Yokoyama A, Higuchi S. Aldehyde dehydrogenase-2 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 2019;23:955–966.
- 14 Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet* 1992;88:344–346.
- 15 Chen S-H, Zhang M, Scott CR. Gene frequencies of alcohol dehydrogenase 2 and aldehyde dehydrogenase 2 in Northwest Coast Amerindians. *Hum Genet* 1992;89:351–352.

- 16 Dandré F, Cassaigne A, Iron A. The frequency of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase I2 (atypical) allele in Caucasian, Oriental and African black populations determined by the restriction profile of PCR-amplified DNA. *Mol Cell Probes* 1995;9:189–193.
- 17 Chen J, Huang W, Cheng C-H, et al. Association between aldehyde dehydrogenase-2 polymorphisms and risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a meta-analysis based on 5,315 Individuals. *Front Neurol* 2019;10:1–10.
- 18 Kamino K, Nagasaka K, Imagawa M, et al. Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:192–196.
- 19 Pang J, Wang J, Zhang Y, et al. Targeting acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in heart failure—Recent insights and perspectives. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2017;1863:1933–1941.
- 20 Zuo W, Zhan Z, Ma L, et al. Effect of ALDH2 polymorphism on cancer risk in Asians. *Medicine (Baltimore)* 2019;98:e14855.
- 21 Park JY, Matsuo K, Suzuki T, et al. Impact of smoking on lung cancer risk is stronger in those with the homozygous aldehyde dehydrogenase 2 null allele in a Japanese population. *Carcinogenesis* 2010;31:660–665.
- 22 Isse T, Oyama T, Matsuno K, et al. Paired acute inhalation test reveals that acetaldehyde toxicity is higher in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice than in wild-type mice. *J Toxicol Sci* 2005;30:329–337.
- 23 Kim J, Chen C-H, Yang J, et al. Aldehyde dehydrogenase 2*2 knock-in mice show increased reactive oxygen species production in response to cisplatin treatment. *J Biomed Sci* 2017;24:33.
- 24 Kastan MMB, Schlaffer E, Russo JEJ, et al. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1990;75:1947–1950.
- 25 Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9118–9123.
- 26 Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, et al. Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology* 2009;49:1992–2000.
- 27 Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, et al. Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiol* 2008;8:13.

- 28 Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:11707–11712.
- 29 Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2004;22:1142–1151.
- 30 Pearce DJ, Bonnet D. The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 2007;35:1437–1446.
- 31 Sládek NE. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:7–23.
- 32 Muramoto GG, Russell JL, Safi R, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase expands hematopoietic stem cells with radioprotective capacity. *Stem Cells* 2010;28:523–534.
- 33 Gasparetto M, Sekulovic S, Brocker C, et al. Aldehyde dehydrogenases are regulators of hematopoietic stem cell numbers and B-cell development. *Exp Hematol* 2012;40:318-329.e2.
- 34 Gasparetto M, Smith CA. ALDHs in normal and malignant hematopoietic cells: potential new avenues for treatment of AML and other blood cancers. *Chem Biol Interact* 2017;276:46–51.
- 35 Ma ACH, Chung MIS, Liang R, et al. A DEAB-sensitive aldehyde dehydrogenase regulates hematopoietic stem and progenitor cells development during primitive hematopoiesis in zebrafish embryos. *Leukemia* 2010;24:2090–2099.
- 36 Morgan CA, Parajuli B, Buchman CD, et al. N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) as a substrate and mechanism-based inhibitor for human ALDH isoenzymes. *Chem Biol Interact* 2015;234:18–28.
- 37 Lioznov M V., Freiburger P, Kröger N, et al. Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:909–914.
- 38 Fallon P, Gentry T, Balber AE, et al. Mobilized peripheral blood SSCcloALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. *Br J Haematol* 2003;122:99–108.
- 39 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645–648.
- 40 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730–737.

- 41 Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* 2004;5:738–743.
- 42 Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 2008;112:568–575.
- 43 Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34⁺ fraction. *Blood* 2010;115:1976–1984.
- 44 Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101:3142–3149.
- 45 Bonnet D. Normal and leukaemic stem cells. *Br J Haematol* 2005;130:469–479.
- 46 Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, et al. A clinically relevant population of leukemic CD34⁺-CD38⁺ cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119:3571–3577.
- 47 Schuurhuis GJ, Meel MH, Wouters F, et al. Normal hematopoietic stem cells within the AML Bone marrow have a distinct and higher ALDH activity level than co-existing leukemic stem cells. *PLoS One* 2013;8:e78897.
- 48 Moreb JS, Ucar D, Han S, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact* 2012;195:52–60.
- 49 Cheung AMS, Wan TSK, Leung JCK, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia* 2007;21:1423–1430.
- 50 Ran D, Schubert M, Taubert I, et al. Heterogeneity of leukemia stem cell candidates at diagnosis of acute myeloid leukemia and their clinical significance. *Exp Hematol* 2012;40:155–165.e1.
- 51 Wu RP, Li H, Rassenti LZ, et al. Increased aldehyde dehydrogenase activity in high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:400–402.
- 52 Song Y-H, Zhong M-Z, Chai Q, et al. The role of aldehyde dehydrogenase 1A1 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol Rep* 2018;39:1261–1268.
- 53 Matsui W, Wang Q, Barber JP, et al. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 2008;68:190–197.
- 54 Boucher K, Parquet N, Widen R, et al. Stemness of B-cell progenitors in multiple myeloma bone marrow. *Clin Cancer Res* 2012;18:6155–6168.

- 55 Zhou W, Yang Y, Gu Z, et al. ALDH1 activity identifies tumor-initiating cells and links to chromosomal instability signatures in multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28:1155–1158.
- 56 Elcheva IA, Wood T, Chiarolanzio K, et al. RNA-binding protein IGF2BP1 maintains leukemia stem cell properties by regulating HOXB4, MYB, and ALDH1A1. *Leukemia* 2020;34:1354–1363.
- 57 Zhang C, Amanda S, Wang C, et al. Oncorequisite role of an aldehyde dehydrogenase in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2020;106:1545–1558.
- 58 Kawasoe M, Yamamoto Y, Okawa K, et al. Acquired resistance of leukemic cells to AraC is associated with the upregulation of aldehyde dehydrogenase 1 family member A2. *Exp Hematol* 2013;41:597–603.e2.
- 59 Yusuf RZ, Saez B, Sharda A, et al. Aldehyde dehydrogenase 3a2 protects AML cells from oxidative death and the synthetic lethality of ferroptosis inducers. *Blood* 2020;136:1303–1316.
- 60 Yuan B, El Dana F, Ly S, et al. Bone marrow stromal cells induce an ALDH⁺ stem cell-like phenotype and enhance therapy resistance in AML through a TGF- β -p38-ALDH2 pathway. *PLoS One* 2020;15:e0242809.
- 61 Foucault A, Ravalet N, Besombes J, et al. Low-dose pesticides alter primary human bone marrow mesenchymal stem/stromal cells through ALDH2 inhibition. *Cancers (Basel)* 2021;13:5699.
- 62 Xu B, Wang S, Li R, et al. Disulfiram/copper selectively eradicates AML leukemia stem cells in vitro and in vivo by simultaneous induction of ROS-JNK and inhibition of NF- κ B and Nrf2. *Cell Death Dis* 2017;8:e2797.
- 63 Conticello C, Martinetti D, Adamo L, et al. Disulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human hematological malignancies. *Int J Cancer* 2012;131:2197–2203.
- 64 Venton G, Pérez-Alea M, Baier C, et al. Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Blood Cancer J* 2016;6:e469.
- 65 Perez-Alea M, Colle J, Yazir M, et al. Dual targeting of ALDH1 and ALDH3: a promising therapeutic approach in acute myeloid leukemia. *Blood* 2019;134:3364–3364.
- 66 Yamagata N, Shimazaki C, Kikuta T, et al. A translocation between 3q21 and 12q24 in a patient with minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Cancer Genet Cytogenet* 1997;97:90–93.
- 67 Cox MC, Scanzani A, Del Poeta G, et al. A novel t(11;12)(q23-24;q24) in a case of minimally-differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0). *Cancer Genet Cytogenet* 2000;118:76–79.
- 68 Bonomi R, Le Coniat M, Leblanc T, et al. Duplication of band 12q24 in acute myeloblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;108:75–78.

- 69 Roulston D, Espinosa R, Nucifora G, et al. CBFA2(AML1) translocations with novel partner chromosomes in myeloid leukemias: association with prior therapy. *Blood* 1998;92:2879–2885.
- 70 Lai JL, Jouet JP, Savary JB, et al. Chronic myelogenous leukemia with t(9;22) and t(8;11): a new chromosome anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;25:103–107.
- 71 Sharp JC, Potter AM, Wood JK. Non-random and random chromosomal abnormalities in transformed chronic granulocytic Leukaemia. *Scand J Haematol* 2009;16:5–12.
- 72 Benton CB, Tanaka M, Wilson C, et al. Increased likelihood of post-polycythemia vera myelofibrosis in Ph-negative MPN patients with chromosome 12 abnormalities. *Leuk Res* 2015;39:419–423.
- 73 McGraw KL, Cheng C-H, Chen YA, et al. Non-del(5q) myelodysplastic syndromes-associated loci detected by SNP-array genome-wide association meta-analysis. *Blood Adv* 2019;3:3579–3589.
- 74 Yunis J, Rydell R, Oken M, et al. Refined chromosome analysis as an independent prognostic indicator in de novo myelodysplastic syndromes. *Blood* 1986;67:1721–1730.
- 75 Xiao Q, Weiner H, Johnston T, et al. The aldehyde dehydrogenase ALDH2*2 allele exhibits dominance over ALDH2*1 in transduced HeLa cells. *J Clin Invest* 1995;96:2180–2186.
- 76 Nannelli G, Terzuoli E, Giorgio V, et al. ALDH2 activity reduces mitochondrial oxygen reserve capacity in endothelial cells and induces senescence properties. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:9765027.
- 77 Wu NN, Ren J. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) and aging: is there a sensible link? vol. 2, 2019:237–253.
- 78 Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, et al. Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity. *J Neurosci* 2008;28:6239–6249.
- 79 Higuchi S, Matsushita S, Murayama M, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. *Am J Psychiatry* 1995;152:1219–1221.
- 80 Matsuo K. Gene-environment interaction between an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) polymorphism and alcohol consumption for the risk of esophageal cancer. *Carcinogenesis* 2001;22:913–916.
- 81 Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, et al. Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. *J Hum Genet* 2003;48:404–409.
- 82 Alter BP. Cancer in the National Cancer Institute inherited bone marrow failure syndrome cohort after fifteen years of follow-up. *Haematologica* 2018;103:30–39.

- 83 Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2014;27:214–221.
- 84 Fanconi G. Commentary on and reprint of Fanconi G, Familiäre infantile perniziösaartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution) [Familial infantile pernicious-like anemia (pernicious blood picture and constitution)], in *Jahrbuch für Kinderheilkunde* (1927) 117. *Jahrb. für Kinderheilkunde.*, vol. 117, Elsevier, 1927:257–89.
- 85 Hira A, Yabe H, Yoshida K, et al. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* 2013;122:3206–3209.
- 86 Yabe M, Yabe H, Morimoto T, et al. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. *Br J Haematol* 2016;175:457–461.
- 87 Ceccaldi R, Parmar K, Mouly E, et al. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2012;11:36–49.
- 88 Langevin F, Crossan GP, Rosado I V., et al. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* 2011;475:53–58.
- 89 Rosado I V, Langevin F, Crossan GP, et al. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol* 2011;18:1432–1434.
- 90 Oberbeck N, Langevin F, King G, et al. Maternal aldehyde elimination during pregnancy preserves the fetal genome. *Mol Cell* 2014;55:807–817.
- 91 Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, et al. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Sci Adv* 2020;6:eabd7197.
- 92 Dingler FA, Wang M, Mu A, et al. Two aldehyde clearance systems are essential to prevent lethal formaldehyde accumulation in mice and humans. *Mol Cell* 2020;80:996–1012.e9.
- 93 Kawashima N, Narita A, Wang X, et al. Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2015;168:460–463.
- 94 Gustavsson P, Willig T-N, Haeringen A van, et al. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet* 1997;16:368–371.
- 95 Gustavsson P, Skeppner G, Johansson B, et al. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a de novo balanced reciprocal X;19 translocation. *J Med Genet* 1997;34:779–782.
- 96 Tsai PH, Arkin S, Lipton JM. An intrinsic progenitor defect in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 1989;73:112–120.

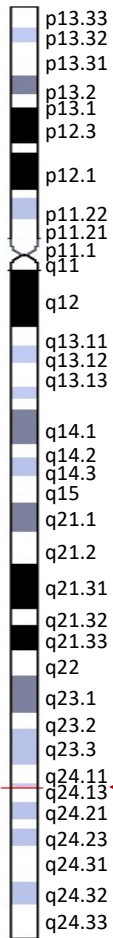
- 97 Per Dahl E, Naprstek B, Wallace W, et al. Erythroid failure in Diamond-Blackfan anemia is characterized by apoptosis. *Blood* 1994;83:645–650.
- 98 Lipton JM, Kudisch M, Gross R, et al. Defective erythroid progenitor differentiation system in congenital hypoplastic (Diamond-Blackfan) anemia. *Blood* 1986;67:962–968.
- 99 Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008;142:859–876.
- 100 Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, et al. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. *Int J Hematol* 2016;103:112–114.
- 101 Chen C-H, Ferreira JCB, Joshi AU, et al. Novel and prevalent non-East Asian ALDH2 variants; implications for global susceptibility to aldehydes' toxicity. *EBioMedicine* 2020;55:102753.

Table 1: ALDH isoenzyme in hematopoiesis

AML: acute myeloid leukemia, ALL: Lymphoblastic leukemia, MDS: myelodysplastic syndrome, CSC: cancer stem cells, HSC: hematopoietic stem cells, RA: retinoid acid, ST: solid tumors, H: hemopoiesis

ALDH gene	Subcellular localisation	genomic localisation	Preferred substrate	Involvement in hematopoiesis	References	Biological processes	References
ALDH1A1	Cytosol	9q21.13	retinal	Myeloid and Lymphoblastic leukemia (AML, ALL) Maintenance, differentiation and expansion of normal stem cells	Elcheva <i>et al</i> , 2020 Chute <i>et al</i> , 2006 Sladek <i>et al</i> , 2003 Muramoto <i>et al</i> , 2010	IGF2BP1 is known functions in regulating HSC self-renewal and ALDH1A1 mediate the IGF2BP1-dependent LSC phenotype Marker of normal stem cells	Elcheva <i>et al</i> , 2020 Chute <i>et al</i> , 2006 Sladek <i>et al</i> , 2003 Muramoto <i>et al</i> , 2010
ALDH1A2	Cytosol	15q22.1	retinal	Aberrantly expressed in more than 50% T-cell acute lymphoblastic leukemia High expression in leukemia, in particular in ARA-C resistant cells	Zhuang <i>et al</i> , 2020 Kawasoe <i>et al</i> , 2013	ALDH1A2 protects against intracellular stress and promotes metabolism and survival of T-ALL cell ALDH1A2 knock-down induces sensitivity to AraC in linear cells, and ALDH1A2 overexpressed in linear cells induces the AraC resistance	Zhuang <i>et al</i> , 2020 Kawasoe <i>et al</i> , 2013
ALDH1A3	Cytosol	15q26.2	retinal	nd	nd	nd	nd
ALDH1B1	Mitochondria	9q11.1	retinal and acetaldehyde	nd	nd	nd	nd
ALDH1L1	Cytosol	3q21.2	10-Formyl tetrahydrofolate	nd	nd	nd	nd
ALDH1L2	Unknown	12q23.3	unknown	<i>In vitro</i> in AML	Yuan <i>et al</i> , 2020	Upregulated in AML cells co-cultured with stromal cells	Yuan <i>et al</i> , 2020
ALDH2	Mitochondria	12q24.2	acetaldehyde, 4-HNE and MDA	<i>In vitro</i> in AML <i>In vitro</i> in MDS AMED syndrom Fanconi Anemia	Yuan <i>et al</i> , 2020 Foucault <i>et al</i> , 2021 Oka <i>et al</i> , 2020 Hira <i>et al</i> , 2013	Upregulated in AML cells co-cultured with stromal cells through the non-canonical TGF- β pathway High activity and expression of ALDH2 in MSCs of myelodysplastic patients Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause AMeD (aplastic anemia, mental retardation, and dwarfism) syndrome HSCs extrated of aldh2/fancd2 double knockout mice accumulate more DNA damage	Yuan <i>et al</i> , 2020 Foucault <i>et al</i> , 2021 Oka <i>et al</i> , 2020 Garaycochea <i>et al</i> , 2012
ALDH3A1	Cytosol, nucleus	17p11.2	aromatic, aliphatic aldehydes	Maintenance, differentiation and expansion of normal stem cells	Chute <i>et al</i> , 2006 Sladek <i>et al</i> , 2003 Muramoto <i>et al</i> , 2010	Marker of normal stem cells	Chute <i>et al</i> , 2006 Sladek <i>et al</i> , 2003 Muramoto <i>et al</i> , 2010
ALDH3A2	Microsomes, peroxisomes	17p11.2	fatty aldehydes	Leukemia in mouse model	Yusuf <i>et al</i> , 2020	ALDH3A2 protects AML cells from oxidative cell death	Yusuf <i>et al</i> , 2020
ALDH3B1	Cytosol	11q13.2	octanal	nd	nd	nd	nd
ALDH3B2	Unknown	11q13.2	unknown	nd	nd	nd	nd
ALDH4A1	Mitochondria	1p36.13	glutamate γ -semi-aldehyde	nd	nd	nd	nd
ALDH5A1	Mitochondria	6p22.2	succinate semi-aldehyde	nd	nd	nd	nd
ALDH6A1	Mitochondria	14q24.3	malonate semi-aldehyde	nd	nd	nd	nd
ALDH7A1	Cytosol, nucleus, mitochondria	5q31	α -Aminoadipic semi-aldehyde	nd	nd	nd	nd
ALDH8A1	Cytosol	6q23.2	retinal	nd	nd	nd	nd
ALDH9A1	Cytosol	1q23.2	γ -aminobutyraldehyde	nd	nd	nd	nd
ALDH16A1	Unknown	19q13.33	unknown	Maintenance primitive erythropoiesis in zebrafish embryos	Ma <i>et al</i> , 2010	<i>aldh16a1</i> might have function in the initiation and/or maintenance of primitive erythropoiesis	Ma <i>et al</i> , 2010
ALDH18A1	Mitochondria	10q24.3	glutamic γ -semi-aldehyde	nd	nd	nd	nd

Chr 12



12q24

ALDH2

disulfiram —| **ALDH2** 12q24.12 ← **alda-1**

deregulation

polymorphism

acute myeloid leukemia
leukemic cells

myelodysplastic syndrome
mesenchymal stem/stromal cells



rs671 26.6 %



↑ activity

Yuan *et al.* (60)



↓ activity

Foucault *et al.* (61)



↓ activity

Hira *et al.* (84)
Yabe *et al.* (85)
Ceccaldi *et al.* (86)
Oka *et al.* (90)
Kawashima *et al.* (92)

congenital disorders

Fanconi anemia
AMED syndrome
idiopathic aplastic anemia

III. L'impact d'une exposition aux pesticides à fortes doses sur le risque de cancers

1) Généralités sur les pesticides

Les pesticides regroupent de nombreuses substances de famille chimique (près de 100 différentes) et de mécanismes d'action très variés. Ils agissent sur les organismes vivants (insectes, vertébrés, champignons, bactéries) pour les détruire, les contrôler, les repousser. Près de 1 000 substances actives ont déjà été mises sur le marché et actuellement, environ 300 substances phytopharmaceutiques sont autorisées en France. Les principaux pays consommateurs de ces composés sont la Chine, les États-Unis, la France, le Brésil et le Japon. Ainsi en France, environ 65 000 tonnes de pesticides sont déversés dans les sols chaque année(65). La majeure partie des pesticides est utilisée pour l'agriculture (90%), mais d'autres secteurs professionnels peuvent être affectés par l'utilisation de ces composés (entretiens des jardins et parcs; secteur industriel; usage en santé humaine et vétérinaire). Il faut ajouter à cette liste les usages domestiques (plantes, animaux, désinsectisation, jardinage, bois). L'évaluation des expositions environnementales aux pesticides doit prendre en compte les usages domestiques mais également la pollution de l'environnement (air, poussières, surface) ainsi que l'ingestion de résidus de pesticides présents dans les aliments et les boissons. Cette ingestion est souvent considérée comme la principale source d'exposition chronique aux pesticides de la population générale (Figure 5). Une des problématiques de ces produits est leur rémanence dans l'environnement. Ainsi, celle-ci peut être de quelques heures à plusieurs années. Certains, comme les organochlorés persistent pendant des années dans l'environnement et se retrouvent dans la chaîne alimentaire.



Figure 5 : Voies d'exposition aux pesticides.

Il existe deux types d'exposition aux pesticides, une exposition à de fortes doses, qui correspond à l'exposition professionnelle et l'exposition à faibles doses qui concernent surtout la population générale, (source : Santé publique France).

2) Pesticides à fortes doses et risque de cancers

Dès les années 1970, plusieurs travaux se sont intéressés aux effets des pesticides sur la santé humaine et particulièrement à leur effet carcinogène(66,67). En 1987, *the Agency for research on Cancer* a conclu que 50% des pesticides évalués présentaient des preuves suffisantes pour un risque cancérigène(68). Des résultats similaires ont été mis en évidence par *the National Cancer Institute / National Toxicology Program* (NCI/NTP) en 1991. Les agriculteurs sont fortement exposés à de nombreuses substances dangereuses, incluant les pesticides et les solvants. La population agricole n'est cependant pas la seule exposée, il s'y ajoute notamment les professionnels saisonniers de l'agriculture, les ouvriers de l'industrie des pesticides et les employés de chemin de fer, des voiries et d'espaces verts au contact d'herbicides notamment. L'exposition de ces travailleurs est très variable : elle diffère selon les secteurs professionnels, par la nature des produits, les quantités utilisées et leur mode d'application.

Il a été initié un certain nombre de projets de recherche afin de clarifier chez cette catégorie socio-professionnelle le risque cancérigène et d'identifier les facteurs de risque(69). En effet, un lien causal reste cependant à démontrer, car d'autres facteurs de risque présents en milieu agricole peuvent jouer un rôle dans les associations retrouvées (exposition au soleil, à d'autres polluants, contact avec des virus du bétail...). La population agricole a été très peu étudiée en France en particulier en termes de survenue de cancer bien que les expositions professionnelles en exploitation agricole concernent plus de 1 million de personnes et que la France soit un des premiers pays utilisateurs de pesticides au monde. Pourtant, d'après de nombreuses études menées principalement chez les agriculteurs nord-américains et scandinaves, certains cancers (hémopathies malignes, cancers cutanés, sarcomes des tissus mous, cancers de la prostate, tumeurs cérébrales, cancers gastriques) sont retrouvés en excès dans cette profession. Il a ainsi été rapporté dès les années 1980 que les agriculteurs auraient un risque plus élevé de développer certains cancers et certaines hémopathies (tableau 1)(70).

Tableau 1 : Les causes de décès chez les agriculteurs(69)

Excesses
Accidents
Leukemia
Non-Hodgkin's lymphoma
Multiple myeloma
Skin (melanoma and other)
Soft-tissue sarcoma
Cancers of the:
Lip
Prostate
Brain
Stomach

En 1993, the *Agricultural Health Study* (AHS) a été initiée pour explorer l'impact des pesticides sur la santé des agriculteurs et de leur famille dans les états de l'Iowa et de Caroline du Nord aux États-Unis. Une revue de 2010, a recensé les études épidémiologiques (publiées avant mars 2009) sur l'exposition des pesticides et l'incidence des cancers dans la cohorte de l'AHS. Ils ont ainsi mis en évidence l'association entre les pesticides et plusieurs types de cancers (tableau 2)(71). Une étude cas témoins dans le sud-ouest de la France, comportant 221 patients avec une tumeur cérébrale et 442 personnes saines, a mis en évidence une association significative entre l'exposition à hautes doses aux pesticides et le développement d'une tumeur cérébrale (odd ratio (OR)=2,16; IC 95 % : 1,10-4,23) et de gliome (OR=3,21; IC 95 % : 1,13-9,11)(72). De la même façon, une étude aux USA a montré que les femmes exposées aux herbicides auraient un risque significativement plus élevé que celles jamais exposées, de développer des méningiomes (OR=2,4; IC 95 % : 1,4-4,3)(73). Concomitamment, une étude menée aux États-Unis a également incriminé de façon significative l'exposition aux herbicides comme augmentant le risque de cancer pulmonaire(74,75).

Tableau 2 : Pesticides et cancers dans la cohorte AHS

Cancer type	Pesticide(s)	Chemical family	Categorical exposure cutoff value	RR or OR ^a (95% CI)	p-Value for trend	References
All cancers	Diazinon	OP	> 109 LD ^b Highest IWLD ^b	1.58 (1.10–2.28) 1.41 (1.03–1.95)	0.007 0.033	Beane Freeman et al. 2005
	EPTC	Thiocarbamate	> 50 LD ^c > 112 IWLD ^c	1.28 (1.09–1.50) 1.16 (1.01–1.35)	< 0.01 0.02	van Bemmelen et al. 2008
	Chlorpyrifos	OP	> 56 LD ^b > 417 IWLD ^b	2.18 (1.31–3.64) 1.80 (1.00–3.23)	0.002 0.036	Lee et al. 2004a
Lung	Diazinon	OP	> 109 LD ^b Highest IWLD ^b	3.46 (1.57–7.65) 1.55 (0.65–3.72)	0.001 0.22	Beane Freeman et al. 2005
	Dicamba	Benzoic acid	> 224 LD ^b	3.10 (1.20–7.70)	0.04	Alavanja et al. 2004
	Dieldrin	OC	> 50 LD ^b > 9 LD ^d	5.30 (1.50–18.6) 2.80 (1.10–7.20)	0.005 0.02	Purdue et al. 2006
	Metolachlor	Chloroacetanilide	Highest IWLD ^d > 457 LD ^b	3.50 (1.60–7.70) 4.10 (1.60–10.4)	0.002 0.015	Alavanja et al. 2004
	Pendimethalin	Dinitroaniline	> 224 LD ^b > 116 LD ^b > 539 IWLD ^b	3.50 (1.10–10.5) 2.40 (1.10–5.30) 1.10 (0.50–2.60)	0.005 0.29 0.94	Hou et al. 2006
	EPTC	Thiocarbamate	> 118 IWLD ^d	2.50 (1.10–5.40)	0.01	Andreotti et al. 2009
	Pendimethalin	Dinitroaniline	> 117 IWLD ^d	3.00 (1.30–7.20)	0.01	
Pancreas	Aldicarb	Carbamate	> 56 LD ^b	4.10 (1.30–12.8)	0.001	Lee et al. 2007a
	Dicamba	Benzoic acid	> 116 LD ^b > 739 IWLD ^b	3.29 (1.40–7.73) 2.57 (1.28–5.17)	0.02 0.002	Samanic et al. 2006
	EPTC	Thiocarbamate	> 50 LD ^c > 112 IWLD ^c	2.09 (1.26–3.47) 2.05 (1.34–3.14)	< 0.01 < 0.01	van Bemmelen et al. 2008
Colon	Imazethapyr	Imidazolinone	> 311 IWLD (proximal) ^b > 311 IWLD (distal) ^b	2.73 (1.42–5.25) 1.21 (0.55–2.68)	0.001 0.75	Koutros et al. 2009
	Trifluralin	Dinitroaniline	> 224 LD ^b > 1176 IWLD ^b	1.48 (0.78–2.80) 1.76 (1.05–2.95)	0.12 0.036	Kang et al. 2008
	Chlordane	OC	> 9 LD ^d Highest IWLD ^d	2.70 (1.10–6.80) 2.10 (0.90–5.30)	0.03 0.04	Purdue et al. 2006
Rectum	Chlorpyrifos	OP	> 56 LD ^b > 417 IWLD ^b > 109 LD ^b	3.25 (1.60–6.62) 3.16 (1.42–7.03) 2.70 (1.20–6.40)	0.035 0.057 0.008	Lee et al. 2004a Lee et al. 2007a
	Pendimethalin	Dinitroaniline	> 116 LD ^c > 539 IWLD ^c	4.30 (1.50–12.7) 3.60 (1.20–11.3)	0.007 0.02	Hou et al. 2006
	Toxaphene	OC	> 56 LD ^b	4.30 (1.20–15.8)	0.123	Lee et al. 2007a
Leukemia	Chlordane/Heptachlor	OC	> 9 LD ^d Highest IWLD ^d	2.60 (1.20–6.00) 2.10 (0.80–5.50)	0.02 0.10	Purdue et al. 2006
	Chlorpyrifos	OP	> 56 LD ^b > 417 IWLD ^b	2.15 (0.96–4.81) 3.01 (1.35–6.69)	0.36 0.15	Lee et al. 2004a
	Diazinon	OP	> 39 LD ^c Highest IWLD ^c	3.36 (1.08–10.5) 2.86 (0.92–9.03)	0.026 0.053	Beane Freeman et al. 2005
All LH	EPTC	Thiocarbamate	> 50 LD ^c > 112 IWLD ^c	2.36 (1.16–4.84) 1.87 (0.97–3.59)	0.02 0.05	van Bemmelen et al. 2008
	Fonofos	OP	> 809 IWLD ^c	2.67 (1.06–6.70)	0.04	Mahajan et al. 2006a
	Alachlor	Chloroacetanilide	> 116 LD ^c > 710 IWLD ^c	2.04 (0.89–4.65) 2.42 (1.00–5.89)	0.02 0.03	Lee et al. 2004b
Brain	Chlorpyrifos	OP	> 56 LD ^b > 417 IWLD ^b	1.43 (0.86–2.36) 1.99 (1.22–3.26)	0.26 0.09	Lee et al. 2004a
	Diazinon	OP	> 39 LD ^c Highest IWLD ^c	1.84 (0.89–3.82) 2.01 (1.02–3.94)	0.094 0.049	Beane Freeman et al. 2005
	Permethrin	Pyrethroid	> 50 LD ^c > 220 IWLD ^c	1.64 (0.07–2.52) 1.31 (0.84–2.04)	0.35 0.60	Rusiecki et al. 2009
NHL	Lindane	OC	> 22 LD ^d Highest IWLD ^d	2.10 (0.80–5.50) 2.60 (1.10–6.40)	0.12 0.04	Purdue et al. 2006
Multiple myeloma	Permethrin	Pyrethroid	> 50 LD ^c > 220 IWLD ^c	5.72 (2.76–11.8) 5.01 (2.41–10.4)	< 0.01 < 0.01	Rusiecki et al. 2009
Bladder	Imazethapyr	Imidazolinone	> 311 IWLD ^b	2.37 (1.20–4.68)	0.01	Koutros et al. 2009
Prostate	Fonofos	OP	> 56 LD ^c > 315 IWLD ^c	1.77 (1.03–3.05) 1.83 (1.12–3.00)	0.02 0.01	Mahajan et al. 2006a (for applicators with a family history of prostate cancer)
	Methylbromide	Halogenated alkane	Highest IWLD ^e	3.47 (1.37–8.76)	0.004	Alavanja et al. 2003
Melanoma	Chlorpyrifos	OP	> 56 LD ^b > 417 IWLD ^b	2.58 (0.73–9.17) 4.03 (1.18–13.8)	0.076 0.036	Lee et al. 2004a
	Carbaryl	Carbamate	> 175 LD ^b Highest intensity score ^b	4.11 (1.33–12.7) 1.54 (0.61–3.86)	0.07 0.92	Mahajan et al. 2007
	Toxaphene	OC	> 25 LD ^d Highest IWLD ^d	2.90 (1.10–8.10) 1.80 (0.70–5.10)	0.03 0.24	Purdue et al. 2006

Abbreviations: LH, lymphohematopoietic cancers; OC, organochlorine; OP, organophosphate. ORs were reported by Alavanja et al. (2003, 2004), Andreotti et al. (2009), and Lee et al. (2007b); all others are RRs.

^aAll RRs and ORs were estimated relative to nonexposed applicators except those reported for alachlor and all LH (Lee et al. 2004b) and dicamba and colon (Samanic et al. 2006) and lung cancer (Alavanja et al. 2004), which are in reference to applicators in the lowest category of exposure. ^bHighest quintile. ^cHighest quartile. ^dHighest tertile. ^eHighest sixth.

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a évalué et classé une soixantaine de pesticides, estimés cancérigènes pour l'homme. Seuls les insecticides arsenicaux sont considérés comme certainement cancérigènes. Récemment, il a classé cinq pesticides comme probablement cancérigènes : le malathion (utilisé aux Antilles pour la prévention du chikungunya), le glyphosate (principe actif du "Round Up" de Monsanto), le parathion, le diazinon et le tetrachlorvinphos (Annexe 1)(76).

D'un point de vue mécanistique, certaines études ont pu montrer une augmentation du stress oxydatif après une exposition aux pesticides. Par exemple, il a été suggéré que le chlorpyrifos pourrait modifier la balance pro et antioxydante, perturbant les mécanismes de défense antioxydante des cellules mammaires(77).

3) Pesticides à fortes doses et risque d'hémopathies

Concernant les hémopathies, la littérature suspecte depuis de nombreuses années qu'une exposition aux pesticides à fortes doses semblerait être associée à un risque accru de myélomes multiples et de lymphomes non Hodgkiniens(78,79). D'ailleurs ces hémopathies sont aujourd'hui reconnues comme des maladies professionnelles. Les agriculteurs (exposés à de fortes doses du fait de leur activité professionnelle) auraient ainsi un risque augmenté(80). Concernant les hémopathies myéloïdes et notamment les leucémies aiguës myéloblastiques, les données de la littérature restent très hétérogènes et nécessitent une actualisation.

Nous détaillerons donc par la suite l'état des connaissances en fonction sur les risques de développer différentes hémopathies dans cette catégorie socio-professionnelle.

Le myélome multiple :

Le myélome multiple (MM) se caractérise par une prolifération maligne de plasmocytes monoclonaux. C'est l'une des hémopathies les plus fréquentes en France. Entre 1995 et 2018, le nombre de MM a augmenté de 96 % chez l'homme et 74 % chez la femme. Cette augmentation serait liée aux changements démographiques pour respectivement 58 % et

43 % alors que 38 % et 31 % de l'augmentation serait liée à l'amélioration du diagnostic, de l'accès aux soins ou serait liée aux facteurs de risque(81).

Le risque de MM en lien avec une exposition professionnelle aux pesticides a déjà été évoqué depuis plusieurs années(69). Plusieurs auteurs ont réalisé des méta-analyses entre 1992 et 2009(70,79,82–84). La plus forte augmentation significative a été observée dans la méta-analyse de Perrotta *et al.* pour les agriculteurs ayant travaillé au moins 10 ans dans une ferme ainsi que pour ceux qui ont été exposés au Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)(84). Concernant les autres familles chimiques de pesticides, une augmentation non significative du risque de myélome multiple a été rapportée chez les travailleurs exposés aux herbicides phénoxy(85). La plupart des auteurs ont observé une hétérogénéité importante entre les résultats des différentes études épidémiologiques. Les auteurs ont donc essayé d'identifier les principales sources d'hétérogénéité qui selon les auteurs seraient (i) le design de l'étude, (ii) l'ajustement des estimateurs des études individuelles selon le niveau d'éducation et les différentes techniques agricoles, (iii) les pesticides utilisés dans le monde et selon les époques(84). Ceci implique une grande prudence dans l'interprétation des résultats des différentes études publiées. Plus récemment, une vaste étude nord-américaine a confirmé une augmentation significative du risque de MM lié à l'utilisation des pesticides, notamment lié à l'utilisation du carbaryl, du captane et du DDT(86). Concomitamment, dans la cohorte française AGRICAN, comptant 180 000 assurés agricoles actifs et retraités, les auteurs ont montré un risque augmenté de MM chez les agriculteurs (i) qui ont commencé à utiliser des pesticides dans les années 1960, en particulier dans les cultures de maïs (≥ 20 ans : OR=1,73; IC 95 % : 1,08-2,78) et (ii) lors de l'utilisation d'insecticides sur les animaux (OR= 1,48; IC 95 % : 1,11-1,98)(87).

L'ensemble des résultats de ces études a été synthétisé dans le rapport de l'INSERM de 2021 « Pesticides et effets sur la santé. Nouvelles données »(81). Ils ont ainsi publié un tableau recensant les familles et les substances actives impliquées dans les excès de risque de MM (tableau 3). L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une présomption forte entre l'exposition professionnelle aux pesticides et le risque de MM (tableau 4). Publié au Journal officiel du 13 avril 2019, le décret n°2019-312 révisé et complète les tableaux des maladies d'origine professionnelle reconnues par le code rural. Il y intègre certaines « hémopathies malignes provoquées par les pesticides », et notamment le myélome multiple(88).

Tableau 3 : Familles et substances actives impliquées dans les excès de risque de myélome multiple(81)

Famille Substances actives	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Organochlorés		
DDT	Population générale	±
Carbamates		
Carbaryl	Population générale	±
Pyréthrinoïdes		
Perméthrine	Applicateurs	+
Aminophosphonate glycine		
Glyphosate	Agriculteurs	± ^a
Autres		
Captane	Population générale	±

+ d'après les résultats d'une cohorte en 2013, confirmé au suivi (AHS) Données nouvelles

± d'après les résultats d'une analyse « poolée » de trois études cas-témoins Données nouvelles

±^a d'après les résultats d'une méta-analyse de trois études cas-témoins et deux analyses de la cohorte AHS qui se recoupent Données nouvelles

Tableau 4 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et myélome multiple(81)

Exposition	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Pesticides (sans distinction)	Agriculteurs, applicateurs	++
	Éleveurs	+

++ d'après les résultats de six méta-analyses et de deux cohortes prospectives (AHS et cohorte nord-européenne) en 2013 ; les nouvelles études ne modifient pas le niveau de présomption.

+ d'après les résultats d'une méta-analyse réalisée à partir de trois cohortes Données nouvelles

Les lymphomes non Hodgkiniens :

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) se caractérisent par des proliférations monoclonales de lymphocytes à différents stades de leur différenciation. Il existe plusieurs sous-types de LNH :

- le lymphome diffus à grandes cellules B
- le lymphome folliculaire
- le lymphome de la zone marginale.

L'importante augmentation de l'incidence des LNH au cours des 30 dernières années a justifié une étude des facteurs de risques environnementaux, et notamment les agents toxiques auxquels sont exposés les agriculteurs (pesticides, engrais, produits chimiques...). Les pesticides retiennent plus particulièrement l'attention des équipes de recherche puisque l'augmentation de l'incidence des LNH a suivi l'introduction massive des molécules organiques de synthèse. En France métropolitaine, les LNH représentaient 60 % des hémopathies malignes avec environ 27 000 nouveaux cas en 2018.

Une revue de la littérature de Schinasi *et al.* a pris en compte les articles parus à partir de 1980 et a intégré au total 44 articles. Une augmentation du risque de LNH a été mise en évidence chez les agriculteurs exposés aux herbicides phénoxy(89,90), aux carbamates/thiocarbamates(91,92) et au glyphosate(90,93,94). Parmi les insecticides, des associations sont identifiées avec les organophosphorés et en particulier avec le malathion(93) et le diazinon(95). Dans le groupe des organochlorés, le lindane(96) et le DDT(90) ont été incriminés. Des associations ont également été identifiées dans les méta-analyses en fonction du type de LNH. Le risque de lymphomes B à grandes cellules serait augmenté après des expositions aux herbicides de type phénoxy(89,90) et aux organophosphorés de type glyphosate(90). Différentes analyses de sensibilité ont été effectuées pour examiner l'impact sur les résultats des sources d'hétérogénéité entre les études, en particulier le sexe des sujets inclus, la zone géographique, la période où les LNH ont été diagnostiqués (1975-1989, 1990-1999 ou à partir de 2000). Ces analyses montrent la robustesse des associations avec les carbamates, les organophosphorés et le lindane(97).

L'ensemble de ces études ont été synthétisées dans le rapport de l'INSERM de 2021 « Pesticides et effets sur la santé. Nouvelles données »(81). Ils ont ainsi publié un tableau recensant les familles et les substances actives impliquées dans les excès de risque de LNH (tableau 5). Ces résultats sont donc en faveur d'une présomption forte entre l'exposition professionnelle aux pesticides et le risque de LNH (tableau 6)(81). Ces études ont permis la publication d'un décret en juin 2015 où le LNH a été inscrit au tableau des maladies professionnelles(98).

Tableau 5 : Les familles et les substances actives impliquées dans les excès de risque de LNH(81)

Famille Substances actives	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Organochlorés		
Lindane (isomère γ HCH)	Applicateurs, agriculteurs	++
HCH (mélange d'isomères)	Éleveurs	+
DDT	Agriculteurs	++
	Professionnels	+
Chlordane*	Agriculteurs	+
Dicamba	Agriculteurs	±
Organophosphorés		
Sans distinction	Agriculteurs	++
	Personnes exposées (professionnellement ou par usage domestique)	+
Terbufos	Applicateurs	+
Diazinon*	Agriculteurs	++
Malathion	Agriculteurs	++
Carbamates / Dithiocarbamates		
Sans distinction (carbamates)	Agriculteurs	+
Butilate	Applicateurs	+
Triazines		
Sans distinction	Ouvriers en industrie de production	+
Phénoxyherbicides non contaminés par les dioxines		
2,4-D	Agriculteurs	+
Aminophosphonate glycine		
Glyphosate*	Agriculteurs, professionnels	+
++ au moins une méta-analyse et au moins une étude de cohorte		
+ au moins une étude de bonne qualité (cohorte et/ou plusieurs études cas-témoins)		
± deux études cas-témoins positives mais une méta-analyse négative de trois cohortes Données nouvelles		
* Matière active pour laquelle le niveau de présomption est passé à un niveau plus élevé par rapport à 2013		

Tableau 6 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et LNH(81)

Exposition	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Pesticides (sans distinction)	Agriculteurs, applicateurs, ouvriers en industrie de production	++
++ d'après les résultats de sept méta-analyses et d'une cohorte prospective (AHS) en 2013 ; les nouvelles études ne modifient pas le niveau de présomption.		

Le lymphome Hodgkinien :

Le lymphome de Hodgkin (LH) se caractérise par la prolifération de cellules anormales clonales développées à partir d'un lymphocyte B, identifiées comme des cellules de Reed Sternberg.

Il représente environ 10 % des lymphomes avec environ 2130 nouveaux cas en France en 2018. Il existe une présomption faible d'un lien entre le risque de LH et l'exposition professionnelle aux pesticides, sans distinction de familles chimiques ou de substances actives, dans le secteur professionnel agricole (tableau 7) et ceci en raison du très faible nombre d'études en faveur de cette association(99,100).

Tableau 7 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et LH(81)

Exposition	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Pesticides (sans distinction)	Professionnels du secteur agricole	±

± d'après les résultats de quatre méta-analyses et d'une cohorte prospective (AHS) en 2013 ; et d'une méta-analyse (deux études cas-témoins), de la mise à jour de la cohorte AHS et d'une étude cas-témoins canadienne ; les données nouvelles ne modifient pas le niveau de présomption par rapport à 2013.

Les syndromes myéloprolifératifs :

Concernant les syndromes myéloprolifératifs, peu d'études s'intéressent à ce risque après une exposition professionnelle aux pesticides. Les syndromes myéloprolifératifs comprennent la leucémie myéloïde chronique, la polyglobulie de Vaquez thrombocytemie essentielle et la myélofibrose primitive. Ces maladies sont des hémopathies clonales caractérisées par un excès de production de cellules myéloïdes matures dans la moelle osseuse.

On retrouve certaines études qui se sont intéressées plus particulièrement à la leucémie myéloïde chronique (LMC). Cependant, cette hémopathie étant très rare, les effectifs de ce type de leucémie ont souvent été poolés avec les effectifs de la leucémie aiguë myéloblastique. Il est donc très difficile de réaliser une analyse spécifique du lien entre le risque de développer cette hémopathie suite à une exposition professionnelle aux pesticides. Une étude de 1993 montre tout de même chez les femmes exposées professionnellement aux pesticides un OR élevé de 4,4 (IC 95 % : 1,7-11,5) pour la leucémie myéloïde chronique et la

leucémie aiguë myéloïde, bien que les pesticides incriminés n'aient pas été caractérisés et/ou quantifiés(101). Plus récemment, une méta-analyse montre un risque significativement plus élevé de développer une LMC chez les agriculteurs et ouvriers agricoles (méta-risque relatif (RR)=1,38; IC 95 % : 1,06-1,79)

La leucémie lymphoïde chronique :

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est secondaire à une prolifération maligne excessive et à un défaut d'apoptose de lymphocytes de phénotype B (CD5+) matures, entraînant un envahissement sanguin et médullaire.

Plusieurs études suggèrent une association entre le risque de LLC et une exposition professionnelle aux pesticides(70). Cependant, les résultats des quelques études qui ont spécifiquement évalué la LLC divergent, indiquant dans les années 80 plutôt une absence d'association(102,103) puis dès les années 90, les études convergent plutôt vers une association positive(104–107). En 2020, une étude espagnole a montré que les sujets les plus exposés aux insecticides, aux herbicides et aux fongicides étaient plus susceptibles de développer une LLC par rapport aux sujets non exposés(108). Ces résultats confirment les associations antérieures retrouvées entre la LLC et l'exposition aux pesticides et fournissent des indications supplémentaires en précisant les types de molécules incriminées.

Le rapport de l'INSERM conclut quant à lui à une présomption moyenne d'un risque de LLC après une exposition professionnelle aux pesticides(81). Le décret n°2019-312 publié au Journal officiel du 13 avril 2019, a également intégré certaines « hémopathies malignes provoquées par les pesticides », et notamment la LLC(88).

Les syndromes myélodysplasiques :

Les SMD sont des hémopathies clonales acquises de la cellule souche hématopoïétique médullaire, caractérisées par une dysmyélopoïèse. Ils s'accompagnent d'une apoptose excessive des précurseurs qui aboutit à des cytopénies périphériques. Dans 30 % des cas, ils évoluent vers une LAM. Dans ces pathologies, on retrouve des anomalies au sein du microenvironnement médullaire et il a été décrit des défauts d'interactions entre les CSM et les CSH(56). Il a également été rapporté que des altérations des CSM elles-mêmes, pouvaient

être à l'origine du développement de la maladie(44). De plus, l'équipe LNOx a récemment montré des modifications du métabolisme oxydatif suggérant la présence d'un stress oxydatif au cours de ces affections (brevet WO2012085188¹³³). L'étiologie des SMD est le plus souvent inconnue, mais dans 15 à 20% des cas ils sont secondaires à une chimiothérapie ou à une radiothérapie. Plus rarement, ils peuvent être secondaires à une exposition aux benzènes ou aux produits utilisés dans l'agriculture(109).

L'exposition aux pesticides augmenterait donc le risque de syndrome myélodysplasique, ce lien ayant été incriminé dans plusieurs études(101,110–113). Une méta-analyse a été publiée par Jin *et al.* afin d'examiner l'implication des pesticides comme potentielle étiologie de ces pathologies. Pour cela, ils ont inclus 11 études cas témoins publiées entre 1990 et 2011. Ils ont pu démontrer une augmentation significative du risque de SMD lors d'une exposition professionnelle aux pesticides (OR=1,95; IC 95 % : 1,23-3,09). Ils ont également étudié ce risque en fonction du type de pesticide et ils ont pu montrer que l'exposition aux insecticides augmentait le risque de MDS de 71 % (OR=1,71; IC 95 % : 1,22- 2,40) comparé aux herbicides (OR=1,16; IC 95 % : 0,55-2,43) et fongicides (OR=0,70; IC 95 % : 0,2-3,2)(114). Les mécanismes biologiques pouvant expliquer cette association sont aujourd'hui méconnus. Cependant, plusieurs mécanismes ont été proposés par les auteurs afin d'expliquer cette augmentation du risque de SMD(114) :

- une surproduction de ROS dépassant les mécanismes physiologiques de régulation des ROS, à l'origine de dommages à l'ADN, et aux protéines,
- un déplacement des ligands endogènes des récepteurs nucléaires stéroïdiens y compris les ligands estrogènes et androgènes, entraînant une activation aberrante des récepteurs et induisant des changements dans le réseau d'expression génique.

Les leucémies aiguës myéloblastiques :

Elles se caractérisent par une prolifération excessive de cellules malignes bloquées dans leur différenciation (blastes) responsable d'un envahissement médullaire et sanguin.

Les données épidémiologiques traitant du lien pouvant exister entre une exposition professionnelle aux pesticides et la survenue de leucémies aiguës sont nombreuses. Plusieurs études ont d'ailleurs été publiées sur ce sujet entre 1995 et 2008. Ces études suggèrent plutôt

un risque augmenté de survenue de leucémies aiguës chez les professionnels exposés à fortes doses aux pesticides, comparé à la population générale. Cette augmentation de risque atteint un niveau de significativité dans plusieurs études(70,83,115) et est à la limite de la significativité pour certaines études(80,116). La plus forte augmentation significative de risque a été observée pour les travailleurs en industries qui produisent des pesticides avec un excès de risque de leucémie de 43 %(115). Quelques études traitent du risque de leucémie après exposition à certains pesticides spécifiques. Une augmentation significative du risque de leucémie a ainsi été suggérée après une exposition à certains organophosphorés tels que diazinon(117) ou le chlorpyrifos(118,119). Des observations similaires ont été rapportées pour les pesticides faisant partie du groupe des carbamates/thiocarbamates. Mils *et al.* ont pu mettre en évidence une augmentation significative du risque de leucémie après une exposition au mancozèbe et une augmentation moindre et non significative après exposition au manèbe(120). Ces études pour certaines, regroupent des sujets avec des hémopathies différentes, tels que les leucémies aiguës et les leucémies chroniques. Ces maladies ne présentent pas la même physiopathologie et ne peuvent donc pas être regroupées ensemble. D'autre part, plusieurs études ont montré une absence de significativité entre le risque de LAM lors d'une exposition à fortes doses aux pesticides(121,122) tandis que certaines montrent une importante significativité(123).

Dans l'expertise de l'INSERM, l'ensemble des leucémies ont été regroupées. Ils ont ainsi identifié les substances pouvant être associées à des excès de risque de leucémies (chroniques et aiguës), (tableau 8). Il est ainsi conclu dans le rapport une présomption moyenne d'un lien entre l'exposition aux pesticides et le risque de survenue de leucémies (chroniques et aiguës), (tableau 9)(81). À l'heure actuelle, cette maladie n'est donc pas inscrite au journal officiel comme maladie professionnelle malgré les fortes présomptions.

Tableau 8 : Familles et substances actives impliquées dans les excès de risque de leucémies(81)

Famille Substances actives	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Organochlorés		
Organochlorés (sans distinction)	Applicateurs	+
Lindane	Applicateurs	+
DDT	Applicateurs	+
Heptachlore	Applicateurs	+
Chlordane + heptachlore	Applicateurs	+
Toxaphène	Agriculteurs	+
Organophosphorés		
Chlorpyrifos	Applicateurs	+
Diazinon	Applicateurs	+
Fonofos	Applicateurs	+
Malathion	Agricultrices	+
Terbufos	Applicateurs	+
Carbamates/Thiocarbamates/ Dithiocarbamates		
S-éthyl-dipropylthiocarbamate (EPTC)	Applicateurs	+
Mancozèbe	Agriculteurs	+
Pyréthrinoïdes		
Deltaméthrine	Agriculteurs	+ ^a
Chloroacétanilides		
Alachlore	Ouvriers en industrie de production	+
Aminophosphonate glycine		
Glyphosate	Applicateurs	±
+ d'après les résultats d'une cohorte ou d'une étude cas-témoins nichée		
+ ^a d'après les résultats de la méta-analyse de trois cohortes d'agriculteurs (Agricoh)		
Données nouvelles		
± d'après les résultats d'une étude de cohorte (AHS) Données nouvelles		

Tableau 9 : Présomption d'un lien entre exposition aux pesticides et leucémies(81)

Exposition	Populations concernées par un excès de risque	Présomption d'un lien
Pesticides (sans distinction)	Agriculteurs, applicateurs, ouvriers en industrie de production	+
+ d'après les résultats de sept méta-analyses et d'une cohorte prospective (AHS) en 2013, et de deux méta-analyses supplémentaires ; les données nouvelles ne modifient pas le niveau de présomption par rapport à 2013.		

4) Contamination de la population générale à proximité des zones agricoles

Depuis quelques années, de nombreuses questions existent sur le niveau d'exposition aux pesticides et les risques potentiels encourus par les populations proches des zones agricoles. Une revue systématique de la littérature de 2021, incluant 27 études, a ainsi permis d'étudier l'exposition des individus aux pesticides grâce à des mesures dans des échantillons biologiques (n = 13), des échantillons environnementaux (n = 11) ou les deux (n = 3)(124). Des indicateurs spatiaux, notamment la proximité résidentielle des champs, la superficie cultivée autour de la résidence et les quantités de pesticides appliqués à proximité ont été identifiés comme des déterminants essentiels de l'exposition aux pesticides dans de nombreuses études. La saison où les pulvérisations de pesticides sont faites semble également avoir un impact non négligeable sur le taux de pesticides retrouvés par la suite dans l'environnement(124) (figure 6). Ces types d'expositions restent tout de même très inférieures à ce que reçoivent les agriculteurs professionnellement exposés.

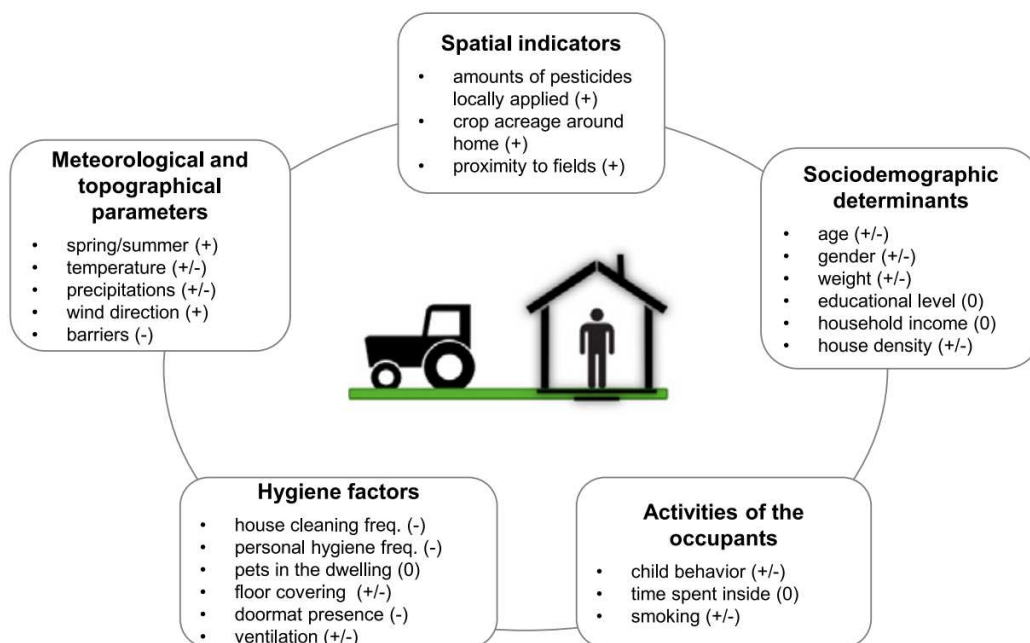


Figure 6 : Les facteurs influençant l'exposition aux pesticides des populations proches des zones agricoles(124)

(+) Association positive dans la littérature avec un risque d'exposition aux pesticides (-) association négative (+/-) résultats contradictoires (0) absence d'association

IV. L'impact d'une exposition aux pesticides à faibles doses sur le risque de cancers

1) Dosage et imprégnation de la population générale française par les pesticides

Afin d'évaluer l'exposition aux pesticides de la population générale, la méthode de référence reste l'utilisation des matrices biologiques, permettant de mesurer la concentration d'un pesticide ou de ses métabolites(81). Ces résultats renseignent sur la charge corporelle d'une substance en intégrant l'ensemble des voies et des sources d'exposition. On distingue 2 types de matrices :

- les matrices internes (sang, tissu adipeux...), utilisées pour le dosage des composés persistants avec une demi-vie de plusieurs semaines à plusieurs années
- les matrices externes (urines, fèces...), l'urine est la plus souvent utilisée, surtout pour le dosage des composés avec une demi-vie de plusieurs jours à quelques heures.

Ces moyens d'évaluation présentent plusieurs désavantages, concernant les matrices internes, leur utilité pour caractériser des expositions passées est limitée à quelques années ou mois précédant le prélèvement. Pour les matrices externes, il faut tenir compte de la diurèse et de la cinétique d'élimination pour interpréter les résultats et elles restent limitées à des composés ayant une demi-vie assez courte. Il existe donc un intérêt croissant pour des matrices externes alternatives, tel que les cheveux qui grâce à leur croissance permettent d'estimer la ou les périodes d'exposition, mais son interprétation reste délicate en raison des processus toxicocinétiques conditionnant l'accumulation des toxiques qui sont à ce jour peu connus. Le méconium suscite lui aussi un grand intérêt pour examiner l'exposition fœtale aux substances, mais il est confronté à ces mêmes difficultés(81).

En France, le volet environnemental de l'Étude Nationale Nutrition Santé (ENNS) réalisée entre 2006 et 2007, a étudié l'exposition de la population française à divers polluants de l'environnement, dont notamment 3 familles chimiques de pesticides (les organochlorés, les organophosphorés et les pyréthrinoides). Ces substances chimiques et leurs métabolites connus ont été dosés dans des prélèvements de sang, d'urine ou de cheveux recueillis dans un échantillon de la population générale. Les résultats de cette étude indiquent des taux de

pesticides de type organochlorés globalement bas et proches des niveaux observés à l'étranger. À l'inverse, d'autres pesticides (paradichlorobenzène et pyréthriinoïdes) sont présents à des taux plus élevés que ceux observés aux États-Unis et en Allemagne(125). De même, les études sur la cohorte nationale ELFE, a permis de mesurer l'imprégnation, chez près de 1077 femmes enceintes françaises, par certains herbicides (l'atrazine et le glyphosate), insecticides et antiparasitaires (propoxur, pesticides organophosphorés, chlorophénols et pyréthriinoïdes) via un dosage urinaire. Ces mesures confirment la présence généralisée des pyréthriinoïdes, tandis que l'exposition aux organophosphorés et aux triazines reste faible(126). Concomitamment, dans une sous-cohorte de l'étude ELFE, une analyse des mèches de cheveux a été réalisée et a permis la détection de 122 substances au moins une fois. De plus, dans chaque échantillon testé un minimum 25 substances ont été retrouvées. Les pesticides les plus souvent identifiés étaient les pyréthriinoïdes et des organophosphorés, mais l'ensemble des 18 familles chimiques de pesticides examinées ont été retrouvées. Ceci confirme la présence de mélanges complexes de plusieurs familles chimiques de pesticides(127).

Les effets à long terme sur la santé des expositions aux pesticides ont été principalement étudiés dans les populations les plus à risque, c'est-à-dire celles exposées professionnellement, à de très fortes doses. Il est très difficile d'étudier des effets sur la santé de la population générale, qui est exposée à de faibles, voire très faibles concentrations. Pour mettre en évidence ces effets, il faudrait faire des études de grande ampleur et suivre pendant une très longue période les personnes incluses dans l'étude afin d'illustrer les conséquences à long terme. De plus, le lien causal entre les résidus de pesticides et les effets sur la santé semble difficile à mettre en évidence du fait d'une exposition de la population générale à de multiples composés présents dans l'environnement et potentiellement cancérigènes.

Quelques études suggèrent tout de même qu'une exposition à faibles doses de façon non professionnelle pourrait augmenter le risque de cancer. Il a été démontré en 2007 que l'exposition à faibles doses (taux résiduel de la vie courante) aux pesticides favorisait le développement de cancers du sein(128). Des études se sont également intéressées aux produits chimiques et aux perturbateurs endocriniens. Ces composés sont persistants, et présents dans l'environnement à des niveaux très faibles. Cependant, ces faibles

concentrations suffisent à provoquer des effets néfastes pouvant entraîner divers problèmes de santé, tels que des troubles de la reproduction, du développement et l'apparition de certains cancers chez les individus(129). Différents mécanismes ont pu être incriminés dans le développement de ces cancers(130) :

- effet prolifératif,
- altération morphologique des cellules,
- augmentation des propriétés migratoires et invasives des cellules mammaires.

2) Les contaminations indirectes

De plus en plus, certaines études ont rapporté une nouvelle voie d'exposition « à la maison » dans laquelle les travailleurs agricoles porteraient des résidus de pesticides sur leur peau, leurs vêtements et leurs chaussures, exposant indirectement leur famille aux pesticides(131). Diverses études indiquent ainsi que les enfants vivant en milieu agricole pourraient être exposés indirectement mais de façon non négligeable aux pesticides(131,132). Cette exposition est particulièrement toxique chez les enfants qui sont plus vulnérables du fait de l'immaturité de leurs systèmes de détoxification et de leur système immunitaire(133). Les enfants s'intoxiqueraient lorsqu'ils jouent sur des surfaces (sols, gazon) potentiellement contaminées par des pesticides après un traitement du sol pour lutter contre des nuisibles ou lors d'une contamination indirecte par les parents utilisant les pesticides de façon professionnelle(133). Hyland *et al.* proposent des facteurs favorisant la toxicité de cette voie d'exposition(134) :

- l'âge de l'enfant : Bradman *et al.* ont ainsi montré en 2011 que le taux de métabolites retrouvés variait en fonction de l'âge des enfants. Il semble cependant difficile d'établir un lien causal. Dans leur revue, Hyland *et al.* concluent que les nouveau-nés sont plus touchés que les enfants un peu plus âgés(134)
- le sexe de l'enfant : deux études(135,136) se sont intéressées à ce facteur mais se sont avérées contradictoires. Aucune conclusion n'a pu être établie par Hyland *et al.*
- la proximité d'une ferme agricole : des études montrent que les enfants vivant près d'une ferme ont un taux plus important de métabolites dans les urines (notamment d'organophosphorés)(136,137). Cette proximité semble donc jouer un rôle évident

- le nombre d'agriculteurs dans le foyer : des études ont pu mettre en évidence un lien significatif entre le nombre d'agriculteurs et le taux résiduel de métabolites retrouvé(138).

Il a été ainsi rapporté des associations entre l'apparition de cancers chez les enfants et l'exposition professionnelle des parents aux pesticides(139–141) . L'exposition à domicile des enfants par des résidus de pesticides chez des familles n'utilisant pas ces composés à titre professionnel a été peu étudiée dans la littérature. Des associations ont tout de même été décrites notamment entre un risque accru de cancer du cerveau chez les enfants lors d'expositions aux pesticides chez les parents, dans les deux ans avant la naissance. Plus particulièrement, il a été suggéré un risque important d'astrocytome lors d'expositions aux herbicides provenant de l'utilisation résidentielle (OR = 1,9; IC 95 % : 1,2-3,0)(142). Chen *et al.* ont publié une méta-analyse dont le but était d'objectiver le lien entre ce type d'exposition et le développement de cancers chez les enfants. Pour cela, ils ont pris en compte 16 études épidémiologiques et ils ont pu mettre en évidence que le risque de cancer était lié au type de pesticides auxquels les enfants étaient exposés et au mode d'exposition. Ainsi, ils ont pu montrer qu'une exposition aux insecticides augmentait significativement le risque de cancer dans l'enfance, et notamment de leucémie aiguë. Ils ont pu également suggérer que l'exposition multiple et répétée augmentait le risque global de développer une hémopathie dans l'enfance(133).

3) La contamination de la chaîne alimentaire

Les données disponibles sur la contamination environnementale montrent la présence généralisée de pesticides ou de leurs métabolites et de leurs produits de dégradation sur les différents territoires mondiaux. Les denrées alimentaires, tels que les fruits et légumes contiennent des résidus de pesticides appartenant à des familles chimiques différentes et ayant des mécanismes d'actions variés. Les denrées alimentaires produites sur ces territoires sont donc encadrées par des dispositifs de réglementation et de surveillance fixant, entre autres, les limites maximales de résidus (LMR) de pesticides. C'est pourquoi l'Union Européenne a mis en place une surveillance de ces résidus de pesticides retrouvés dans l'alimentation par *the European Food Safety Authority* (EFSA)(143). Même si les études montrent que la consommation de fruits et légumes n'engendre pas une exposition

supérieure aux doses journalières acceptables (définies par l'EFSA) aux différents pesticides retrouvés en Europe, elles ne prennent pas en compte les résidus également présents dans les eaux de boisson et lors des manipulations directes à domicile(144). Il faut donc considérer que l'origine alimentaire n'est que partiellement responsable des contaminations humaines (Figure 5). L'exposition chronique à de multiples pesticides à faibles doses, aux effets potentiellement additifs, représente un risque réel pour la population générale. Les effets cumulatifs des pesticides pourraient donc donner lieu à des impacts sanitaires difficilement prévisibles actuellement, ce qui fait de la question des mélanges et des faibles doses un des enjeux importants de la recherche et de l'évaluation des dangers. L'évaluation des risques des pesticides présents dans les aliments est fondée sur l'évaluation toxicologique des composés isolés; aucune procédure internationale acceptée n'existe pour une évaluation de l'exposition cumulative à de multiples résidus de pesticides dans les cultures, excepté dans quelques familles de pesticides(145). À l'heure actuelle, il n'a pas été retrouvé un réel lien causal entre la survenue de cancers et l'exposition aux différents résidus de pesticides.

Dès 2008, l'EFSA a publié un rapport où sont répertoriés les résidus de pesticides retrouvés dans différents aliments analysés spécifiant notamment ceux dépassant les limites autorisées, l'*Acceptable Dose Intake* (ADI)(146). La famille des dithiocarbamates (DTC) comprenant le maneb et mancozeb a été retrouvée à des taux excédant les normes réglementaires, notamment dans des échantillons d'épinard (Figure 7). Concomitamment, il a été mis en évidence que 22 % des 4738 échantillons analysés contenaient plusieurs résidus de pesticides différents (en moyenne 2 à 3 résidus différents). Sept pesticides (imazalil, chlorpyrifos éthyle, iprodion, et les dithiocarbamates) ont été largement identifiés dans les échantillons de fruits et légumes étudiés. L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a récemment classé le chlorpyrifos éthyle, l'iprodion et l'imazalil comme les pesticides les plus fréquemment retrouvés dans l'alimentation. Ils ont aussi rapporté que le diméthoate était détecté à des taux excédant la valeur de référence de toxicité (Figures 8 et 9)(143). Dans le rapport de 2016 de l'EFSA(147), 12 168 échantillons ont été analysés couvrant 165 pesticides dans 11 aliments. Globalement, 98,3 % des échantillons analysés en 2016 se situaient dans les limites légales (11 965 échantillons) ; 6 367 échantillons (52,3 %) étaient exempts de résidus quantifiables (résidus inférieurs à la limite de quantification). Le nombre d'échantillons avec des résidus quantifiés, mais dans les limites

autorisées par la loi était de 5 598 (46,0 %). Dans 1,7 % des échantillons analysés, la LMR était dépassée. La famille des dithiocarbamates a notamment été identifiée comme une classe de pesticides excédant les limites réglementaires, (Figure 10). En outre, des résidus de plus d'un pesticide, appelé résidus multiples, ont été retrouvés dans 30,1 % des échantillons, un taux qui augmente en comparaison avec le rapport de 2008. La fréquence des résidus multiples dans les produits non transformés (32,5 %) est plus élevée que dans les produits transformés (13,4 %). Dans les produits non transformés, la fréquence la plus élevée de résidus multiples a été trouvée dans les groseilles à maquereau (85,7 % du total des échantillons analysés), le houblon (81,8 %), les pamplemousses (73,1 %), les groseilles (72 %), les mûres (68,4 %), le raisin (68,1 %), les framboises (66,9 %) et les fraises (65,4 %). Concernant le dernier rapport de 2018(148), 11 679 échantillons ont été analysés, 6 770 échantillons (58 %) se sont avérés être exempts de résidus quantifiables, 166 échantillons (1,4 %) contenaient des concentrations de résidus dépassant les LMR. Une discrète augmentation a été signalée pour les résidus multiples (29,1 %) par rapport à 2017 (27,5 %). Parmi les échantillons avec des résidus multiples, 10% des échantillons comportent plus de 2 résidus, 7% des échantillons comportent plus de 3 résidus, 5% des échantillons comportent plus de 4 résidus et 7% des échantillons comportent au moins 5 ou plus de 5 résidus de pesticides (Figure 11).

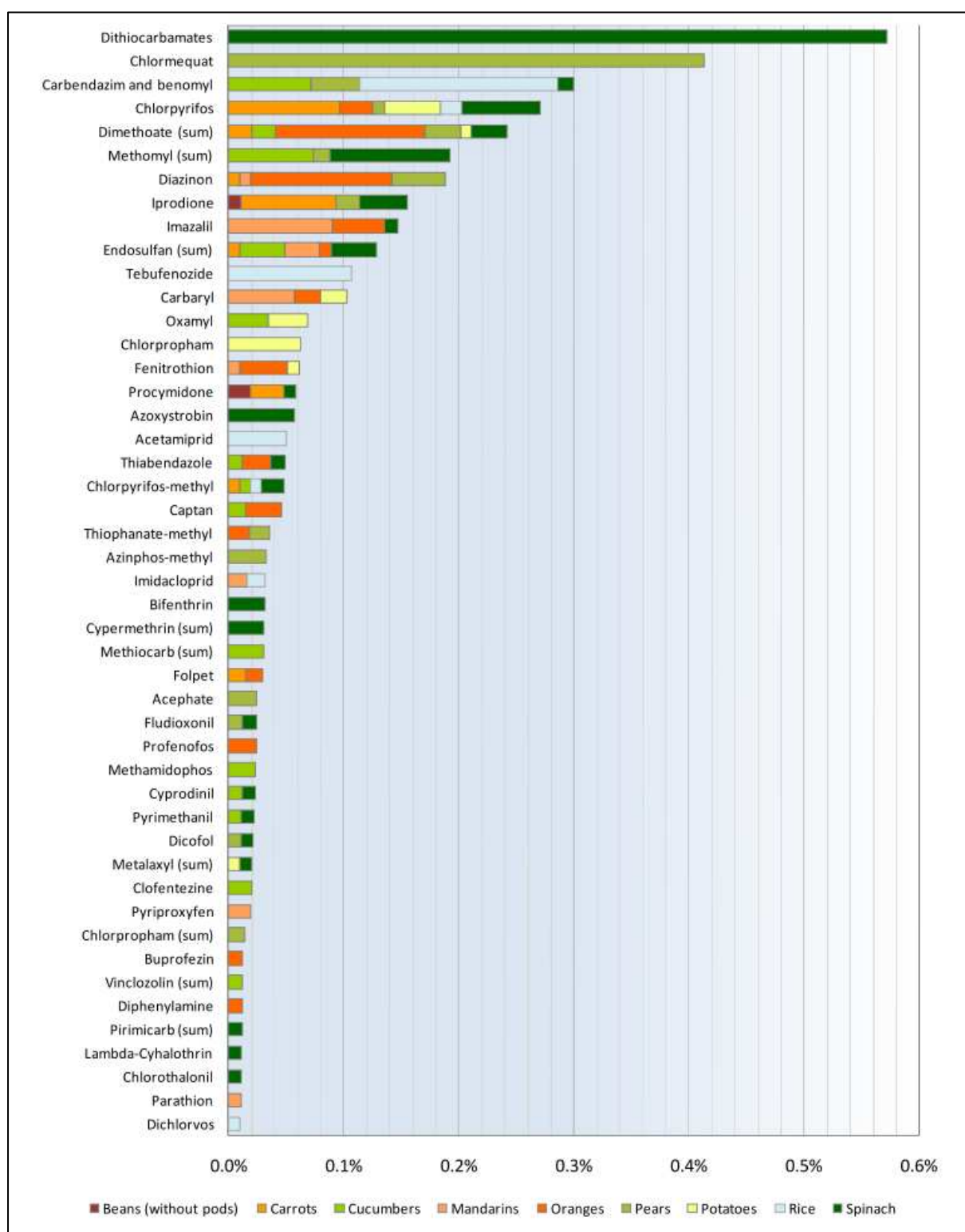


Figure 7 : Représentation des pesticides dont les résidus retrouvés dans l'alimentation excèdent la limite autorisée, au cours de l'année 2008(146)
 Le pourcentage d'aliments dépassant la limite autorisée est représenté en abscisse.

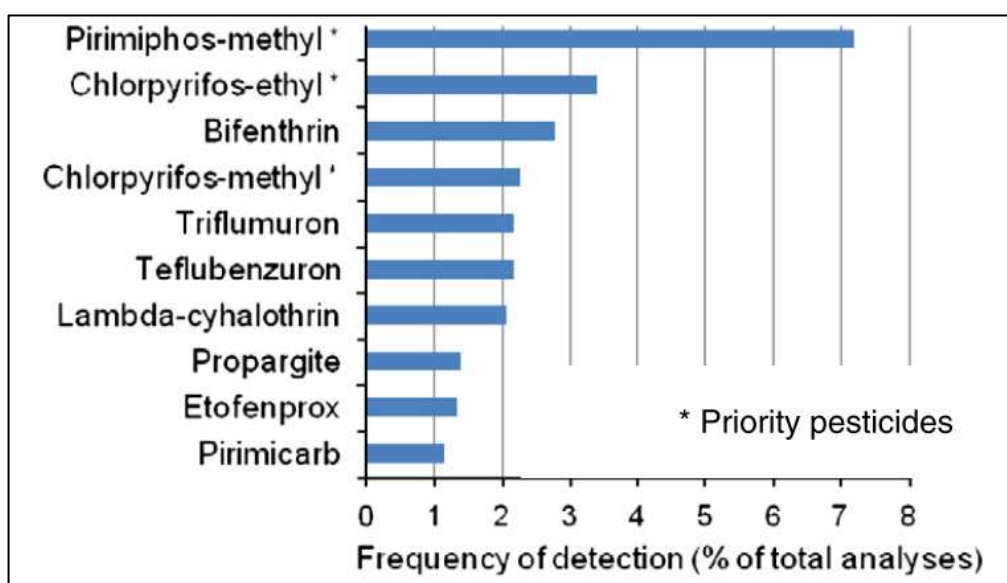


Figure 8 : Insecticides et acaricides les plus souvent détectés(143)

La fréquence de détection est représentée en abscisse, elle correspond à la fréquence où des échantillons ont été retrouvés dépassant la limite autorisée.

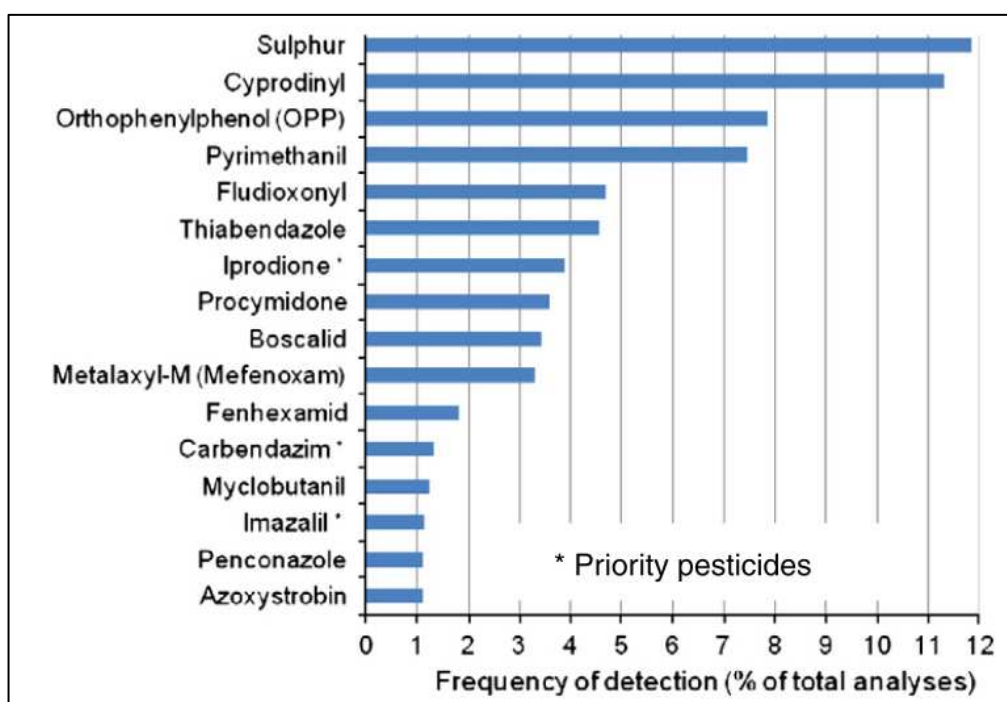


Figure 9 : Fongicides les plus souvent détectés(143)

La fréquence de détection est représentée en abscisse, elle correspond à la fréquence où des échantillons ont été retrouvés dépassant la limite autorisée.

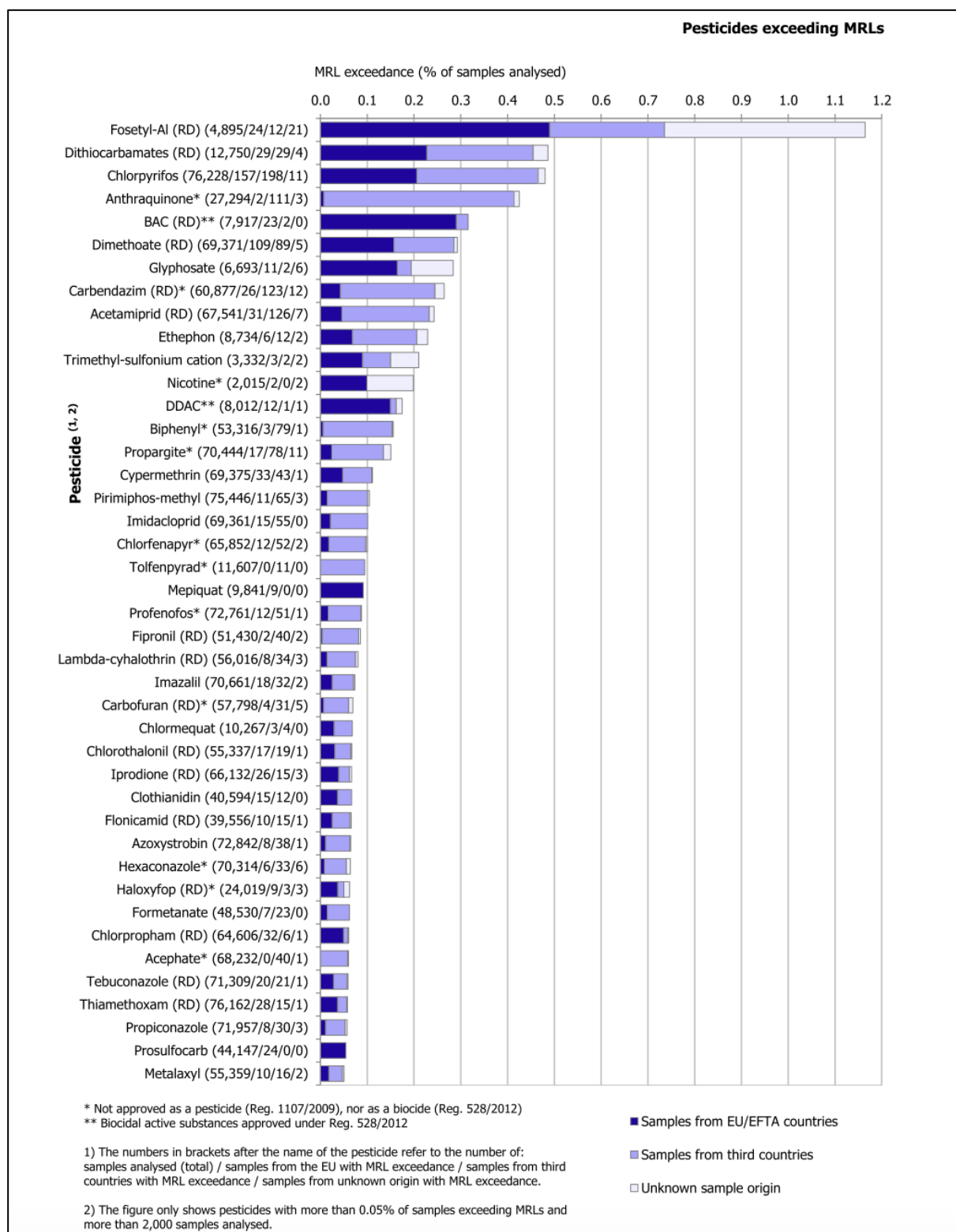


Figure 10 : Représentation des pesticides dont les résidus retrouvés dans l'alimentation excèdent la limite autorisée, au cours de l'année 2016

Le pourcentage d'aliments dépassant la limite autorisée est représenté en abscisse. L'origine de l'échantillon également indiquée par un code couleur.

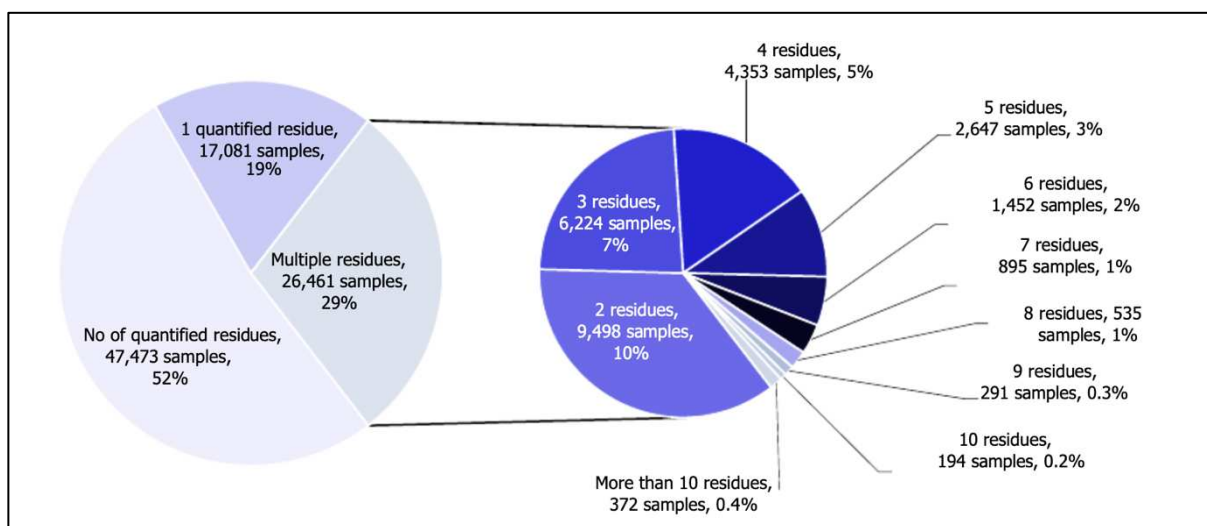


Figure 11 : Pourcentage d'échantillons avec des résidus de pesticides simples ou multiples
Parmi les échantillons analysés, 29 % des échantillons comportent des résidus multiples, 10 % contiennent 2 résidus, 7 % 3 résidus, 5 % 4 résidus et 7 % 5 ou plus de 5 résidus de pesticides.

D'autre part, il a été établi qu'une exposition des CSM médullaires aux sept pesticides les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement pouvait induire leur sénescence en générant une augmentation des ROS(149). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'exposition à ces pesticides favorisait la différenciation adipocytaire des CSM or il a été établi que les adipocytes jouaient un rôle primordial dans le microenvironnement. En effet, ils auraient un rôle régulateur dans les situations normales et à l'inverse seraient indispensables à la survie et à la prolifération des blastes dans les cas de leucémies aiguës myéloïdes(150). De la même façon, ils ont montré que les pesticides sensibilisaient aux mutations oncogéniques. Ainsi, après avoir modifié des CSM (1 hit ou 4 hits) exposées ou non à un cocktail de sept pesticides, tous à la dose ADI (définie par l'EFSA) et après avoir injecté ces cellules dans le tibia de souris, ils ont constaté le développement systématique de tumeurs chez les souris pour lesquelles les CSM injectées avaient subi un prétraitement par le mélange de pesticides(149). Ces différentes données laissent présager un impact non négligeable des pesticides à l'état résiduel, sur le micro-environnement médullaire et sur le risque d'hémopathie. Plus récemment cette même équipe a mis en évidence que ce même mélange de sept pesticides, fréquemment détecté dans les échantillons alimentaires, induisait sur les CSM adultes un ensemble de caractéristiques classiquement retrouvées dans les tissus âgés, entraînant un vieillissement cellulaire accéléré(151).

V. Le manèbe et mancozèbe : deux pesticides d'intérêt

1) Généralités

Le manèbe et le mancozèbe appartiennent à la famille des dithiocarbamates dont l'utilisation est très répandue depuis 1940 afin de protéger les cultures contre de nombreux champignons plus souvent sur les cultures maraichères, céréalières, arbres fruitiers et vignes. Cette famille comprend quatre molécules référencées dans le catalogue des produits phytosanitaires de l'ANSES : le manèbe, le mancozèbe, le zinèbe et le mancopper. Elles se présentent toutes sous la forme de polymères constitués du même squelette éthylènebisdithiocarbamate et d'un atome de métal différent selon la molécule (Figure 12).

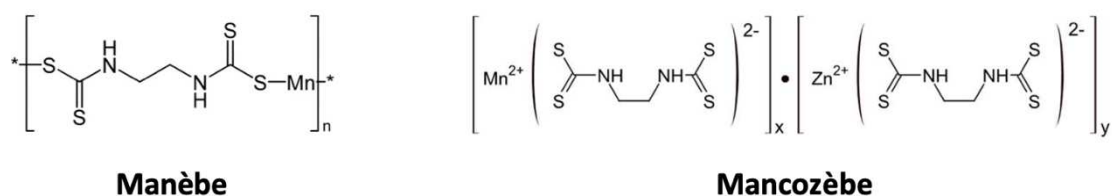


Figure 12 : Structure chimique du manèbe et du mancozèbe

Leur large utilisation s'explique en partie par leur faible potentiel d'induction de résistances. En effet, ils possèdent des mécanismes d'action impliquant des acteurs protéiques variés : inactivation d'enzymes impliquées dans de nombreuses voies de biosynthèse et de transport dans le cytoplasme fongique, ou inhibition de la production d'ATP par blocage du cycle de Krebs et d'enzymes impliquées dans le métabolisme terminal du glucose(152).

2) Profil toxicologique des dithiocarbamates

La toxicité aiguë :

Les fongicides de la famille des dithiocarbamates ont une toxicité aiguë extrêmement faible, quelle que soit la voie d'exposition (orale, cutanée ou respiratoire)(153). Chez l'Homme, l'exposition aiguë par voie cutanée en milieu professionnel est la seule rapportée dans la littérature. Elle est responsable d'irritations de la peau et des muqueuses, ainsi que de phénomènes de sensibilisation (eczéma, photosensibilisation) en cas d'expositions répétées(154,155).

Toxicité à long terme :

Les dithiocarbamates partagent un profil de toxicité à long terme comparable, notamment en raison de leur métabolite commun : l'éthylène thio-urée (ETU). Des études effectuées sur l'animal ont démontré les propriétés antithyroïdiennes des dithiocarbamates et de l'ETU. Chez l'Homme, des perturbations de la fonction thyroïdienne ont pu être mises en évidence avec une augmentation des taux de *thyroid stimulating hormone* (TSH) ou la présence de nodules thyroïdiens isolés chez des ouvriers agricoles exposés aux dithiocarbamates(156,157).

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent aussi un lien entre l'exposition aux pesticides et la survenue d'une maladie de Parkinson. En 2009, l'équipe de Costello *et al.* a montré qu'une exposition conjointe au manèbe et au paraquat augmentait de 75% le risque de développer une maladie de Parkinson(158). En 2018, les données issues d'une cohorte d'agriculteurs français (cohorte AGRICAN) ont confirmé le lien entre exposition aux dithiocarbamates et développement d'une maladie de Parkinson(159).

Génotoxicité / cancérogénicité :

Le CIRC classe le manèbe dans le groupe 3 «agent inclassable quant à sa cancérogénicité»(160). Il n'existe que peu de données épidémiologiques humaines concernant spécifiquement le lien entre cancer et exposition aux dithiocarbamates. Une étude norvégienne conduite sur 236 646 agriculteurs n'a pas mis en évidence de corrélation entre exposition au mancozèbe et cancer de la thyroïde(161). Cependant, un risque augmenté d'hémopathie lymphoïde a été observé dans une étude cas-témoin menée en Californie sur une cohorte de 139 000 agriculteurs exposés au manèbe ou au mancozèbe(120).

3) Effet *in vitro*

Plusieurs études ont examiné l'impact d'une exposition à de faibles doses de manèbe ou de mancozèbe sur divers types cellulaires. Des études menées avec le mancozèbe n'ont pas montré de modification de la prolifération de cellules issues de la granulosa d'embryons de souris et d'embryons humains(162), de cellules mononuclées sanguines (CMN) ou de fibroblastes murins(163). Le manèbe n'impactait pas non plus la prolifération de cellules

souches embryonnaires neuronales de rat. En revanche, la concentration la plus élevée (10 μ M) était responsable d'une mort cellulaire accrue par un phénomène d'apoptose(164).

Les mécanismes d'actions des dithiocarbamates sur le métabolisme fongique étant très variés, dont l'action au niveau de la production d'ATP et du cycle de Krebs, les auteurs se sont intéressés au niveau de ROS dans les cellules exposées à ces deux pesticides. Dans l'étude menée par Calviello *et al.*, il existait une augmentation des cassures simples-brins de l'ADN aussi bien dans les fibroblastes murins que dans les CMN murines exposées au mancozèbe. Une augmentation des ROS intracellulaires ainsi qu'un taux plus élevé de désoxyguanosine hydroxylée (8-OHdG), témoin de dommages oxydatifs à l'ADN, étaient observés. Dans tous les cas, il existait une relation dose-réponse, même si elle semblait moins prononcée dans le cas des CMN(163). En revanche, il n'existait pas de modification du niveau de ROS intracellulaires dans les cellules souches embryonnaires neuronales de rat exposées au manèbe(164).

PARTIE 2 : OBJECTIFS DE LA THESE

L'impact des pesticides sur les hémopathies myéloïdes reste à ce jour peu décrit dans la littérature. Alors que certaines hémopathies lymphoïdes sont aujourd'hui reconnues comme des maladies professionnelles, aucune hémopathie myéloïde n'apparaît dans le journal officiel. Au cours de cette étude, je m'intéresse donc à l'impact des pesticides sur le risque d'hémopathies myéloïdes.

On a pu décrire deux types d'expositions à ces pesticides : (i) une exposition professionnelle où les usagers sont exposés chroniquement à de très fortes doses et (ii) une exposition à des résidus de pesticides présents dans l'environnement où la population générale, est exposée chroniquement à de très faibles doses de multiples pesticides. La partie des résultats se composera donc de deux parties : une ciblée sur l'exposition professionnelle à des fortes doses et une sur l'exposition de la population générale à des faibles doses de pesticides.

Dans une première partie, je présente ainsi une méta-analyse ciblant l'impact des pesticides sur le risque de LAM lors d'une exposition professionnelle aux pesticides. En effet, ce lien n'était jusque-là, pas scientifiquement établi. Les études publiées sur cette problématique présentent une grande hétérogénéité dans leurs résultats, et nécessitent une mise à jour en utilisant des critères d'inclusion très précis pour étudier le lien probable entre le risque de LAM lors d'une exposition professionnelle aux pesticides. Nous avons donc réalisé une méta-analyse ayant pour but d'étudier cette probable association.

Dans la seconde partie des résultats, nous avons étudié l'impact d'une exposition chronique à de faibles doses de pesticides sur le microenvironnement médullaire. En se basant sur les données publiées par l'EFSA, et les résultats déjà publiés par l'équipe de François Vallette j'ai exposé des CSM médullaires primaires saines à un cocktail de 7 pesticides, les plus fréquemment retrouvés dans les fruits et légumes. Des CSM médullaires primaires de patients myélodysplasiques ont également été étudiées, puisque l'exposition chronique des populations pourrait être impliquée dans la physiopathologie des SMD. Enfin, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à deux pesticides d'intérêt : le manèbe et le mancozèbe, des dithiocarbamates, dépassant fréquemment les limites réglementaires dans l'alimentation.

PARTIE 3 : IMPACT DES PESTICIDES SUR LE RISQUE DE LAM ET SUR LE MICROENVIRONNEMENT MÉDULLAIRE

Nous présenterons ainsi dans la partie des résultats (i) notre étude basée sur le risque de LAM après une exposition à de fortes doses de pesticides, puis (ii) notre étude expérimentale basée sur l'impact d'une exposition à de faibles doses de pesticides sur le microenvironnement médullaire et sur le risque de SMD.

I. Exposition professionnelle aux pesticides et le risque de LAM

1) Introduction

Alors que le risque d'hémopathie lymphoïde est clairement identifié après une exposition professionnelle aux pesticides(165), le risque d'hémopathie myéloïde est lui plus controversé. Récemment une étude a ainsi montré un risque significativement plus élevé de déclarer un SMD suite à une exposition à fortes doses de pesticides, (OR = 1,95; IC 95 % : 1,23-3,09)(114). Concernant le risque de LAM après une exposition professionnelle aux pesticides, les résultats dans les études divergent. Ainsi en 2007, une méta-analyse a été réalisée, celle-ci ne montrait pas de risque significativement plus élevé de LAM dans les études cas témoin (OR = 1,00; IC 95 % : 0,87-117) alors que le lien semblait bien établi dans les études de cohortes (RR = 2,14; IC 95 % : 1,02-2,34)(80). Cependant cette méta-analyse a inclus 6 études problématiques notamment dans la définition du groupe des contrôles (3 études incluaient des contrôles avec un antécédent de cancers et 3 études incluaient des LAM définies sur simple certificat de décès). Enfin, cette étude datant de 2007 nécessitait une remise à jour afin d'actualiser les données sur cette possible association, tout en définissant des critères stricts afin de répondre précisément à la question.

Nous avons donc réalisé une nouvelle méta-analyse publiée en 2021 dans Scientific Reports (166) et centrée sur les études cas-contrôles afin d'étudier le risque de survenue de LAM chez une population exposée à de fortes doses de pesticides. Parmi les 6784 références extraites, 14 ont été sélectionnées, représentant 3 955 patients atteints de LAM et 9 948 sujets contrôles diagnostiqués entre 1976 et 2010. Nous avons ainsi montré un risque significativement plus élevé de LAM après une exposition professionnelle aux pesticides (OR = 1,51; IC 95 % : 1,10-2,08), ce résultat n'était pas affecté par les études de sensibilité. L'asymétrie du Funnel plot a quant à lui suggéré un biais de publication sous-estimant l'OR global. Une analyse de sous-groupe a montré que l'association était d'autant plus importante lors d'une exposition

professionnelle aux insecticides (OR = 1,45; IC 95 % : 1,16-1,81), et dans la population asiatique (OR = 1,74; 96 % IC : 1,32-2,30).



OPEN

Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case–control studies including 3,955 cases and 9,948 controls

Amelie Foucault^{1,2,5}, Nicolas Vallet^{3,5}, Noemie Ravalet^{1,2}, Frederic Picou^{1,2}, Marie C. Bene⁴, Emmanuel Gyan^{2,3} & Olivier Herault^{1,2}✉

The impact of pesticides on health is a major public health concern. A higher risk to develop chronic lymphoid malignancies has been demonstrated to be associated with occupational pesticide exposure (OPE). By contrast, little is known of the impact of OPE on the occurrence of myeloid malignancies especially acute myeloid leukemia (AML). The purpose of this meta-analysis is to summarize data on the association between OPE and AML. A relevant dataset of case–control studies was extracted. Among 6784 references extracted, 14 were selected, representing 3,955 AML patients and 9,948 control subjects diagnosed between 1976 and 2010. An adverse association was found between OPE and AML (OR = 1.51; 95%CI: 1.10–2.08), not affected by sensitivity analyses. Funnel plot asymmetry suggested a publication bias underestimating OR. Stratified analysis showed the association to be driven by studies with: (1) monocentric AML patients and hospital-based control population, (2) Newcastle–Ottawa scale > 6 and the group of studies identified as with the lowest risk, (3) exposure assessment through peer-to-peer interview, (4) diagnosis in North America and Asia and after 1995, (5) restriction to de novo AML. Moreover, the association between OPE and AML was significant with insecticides. These findings broaden the spectrum of pesticide toxicity to myeloid malignancies.

The worldwide usage of pesticides has been steadily increasing since the 90's, from 1.5 kg/ha in 1990 to 2.6 kg/ha in 2016¹. Thus, potential deleterious effects on human health of pesticide exposure are a current major public health concern. Pesticides include a large variety of molecules, classified according to their target (herbicides, fungicides, insecticides)².

Lymphoid and myeloid neoplasms are classified by the World Health Organization (WHO) according to clinical, histological, cytological, immunophenotypic and molecular characteristics^{3,4}. Molecular mechanisms leading to chronic and acute hematological malignancies are heterogeneous and impact different types of hematopoietic precursor cells^{3,4}. The carcinogenic effects of pesticides have been thoroughly investigated in lymphoid hematological malignancies, revealing a pejorative impact of occupational pesticide exposure (OPE) on the incidence and outcome of non-Hodgkin lymphoma^{5–11}. This association has not been clearly demonstrated to date in myeloid malignancies, especially acute myeloid leukemia (AML). This is due to the inappropriate definition of “AML”, often pooled with other leukemias (lymphoid, acute and chronic myeloid leukemia) and poorly characterized^{12–14}. Moreover, because pathogenesis varies from one hematological malignancy to another, the impact of OPE cannot be generalized^{3,4}.

AML include several subtypes of myeloid malignancies based on cytological, immunophenotypic, cytogenetic or molecular characteristics^{3,15}. AML is the most common type of acute leukemia in adults, accounting for about

¹Department of Biological Hematology, Tours University Hospital, Tours, France. ²CNRS ERL7001 LNOX, EA 7501, Tours University, Tours, France. ³Department of Hematology and Cell Therapy, Tours University Hospital, Tours, France. ⁴Department of Biological Hematology, Nantes University Hospital, Nantes, France. ⁵These authors contributed equally: Amelie Foucault and Nicolas Vallet. ✉email: olivier.herault@univ-tours.fr

1% of all cancers¹⁶. In myelodysplastic syndromes (MDS), known to be pre-leukemic diseases^{3,15}, a meta-analysis of case-control studies revealed an association with OPE (odds ratio [OR] = 1.95; 95%CI: 1.23–3.09)¹⁷. Regarding myeloid leukemias, a meta-analysis performed in 2007 included 17 cohort and 16 case-control studies focused on chronic and acute myeloid leukemia. In the AML subgroup, this study reported an association between OPE and AML exclusively in cohort studies (relative risk [RR]: 1.55; 95%CI: 1.02–2.34) but not in case-control studies¹⁸. This difference is possibly due to the case-control studies method that exposes to recall bias¹⁹. Additionally, the risk of AML in this meta-analysis was possibly underestimated since cancer patients, who have a higher risk of developing AML²⁰, were included as controls in three (25%) studies. Finally, in three other studies, AML cases were exclusively identified based on the cause of death on death certificates, well known to be imprecise²¹ and only selecting non-surviving patients obviously unable to answer questionnaires.

It thus appeared to us that a new meta-analysis of case-control studies, including more recent publications and based on stringent inclusion criteria, was necessary to possibly reinforce the results of cohort studies and confirm that OPE increases the risk of AML. Following the Preferred Reporting Items of Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement²², this meta-analysis of 14 studies published between 1986 and 2017 confirmed a significant adverse association between OPE and AML (OR = 1.51; 95%CI: 1.10–2.08) which further supports the impact of pesticides on AML pathogenesis.

Methods

Literature search strategy and selection process. According to PRISMA statement²², an extensive search was performed to identify manuscripts reporting studies that evaluated an association between adult AML and OPE. The MEDLINE, EMBASE and Cochrane databases were exploited from 1946 to 2020. References and abstracts were extracted on September 1st, 2020. To identify studies reporting any type of pesticides molecule and knowing that pesticides may be referenced as different types of “chemicals”² or appear in demographic studies, three search strategies were used, focused on pesticides, demographics and chemical exposure data. These strategies are described in Supplementary Methods. Firstly, references were hand-selected according to title and abstracts and classified as relevant or irrelevant. Secondly, eligibility was assessed through full text review and articles classified according to their inclusion or main reason for non-inclusion. Each step of the systematic review process was performed concomitantly and independently by two investigators of this study (AF and NV). Disagreements were resolved by consensus and when no consensus was achieved, the opinion of two other investigators (OH and EG) was asked for. Results of the first and second steps are detailed in Supplementary Datasets 1 and 2.

Eligibility. Stringent inclusion criteria were chosen to limit the risk of bias regarding AML incidence and pesticide exposure. Studies meeting the following criteria were included: (1) case-control design, (2) available data specific for AML patients (excluding pooled leukemias), (3) AML diagnosis excluding patients identified only through death certificates, (4) controls not restricted to cancer databases, (5) specific report of exposure to pesticides, including all studies with any kind of pesticide exposure, one class of pesticide exposure or indirect chronic exposure during work or any activity (6) sufficient data to analyze (number of patients AND/OR odd ratio AND/OR adjusted odd ratio with 95%CI), (7) adult patients (≥ 15 years-old), (8) English language. In case of overlapping study populations, the most recent and detailed study was chosen for the meta-analysis. Unpublished studies and abstracts were not considered.

Data extraction. Extracted data are described in Supplementary Methods. No author was contacted for further information. Data extraction was concomitantly and independently performed by two investigators of this study (AF and NV). Disagreements were resolved by consensus or two investigators (OH and EG).

Quality assessment. Quality assessment of the study was conducted using the well-described Newcastle–Ottawa scale (NOS)²³. This scale describes each case-control study according to selection, comparability and exposure definition as well as assessment criteria. Because lack of reproducibility is criticized with NOS²⁴, none of the studies was excluded on the basis of this score and, as mentioned above, two investigators (AF and NV) independently assessed each study and confronted their results. Disagreements were resolved by consensus or by the opinion of two other investigators (OH and EG).

Bias and confounding factors. Known AML risk factors are age, male gender, exposure to ionizing agents or benzene, previous cytotoxic treatment, MDS or genetic predispositions²⁵. It turned out to be impossible to adjust our meta-analysis estimate for these known confounding factors, due to the lack of individual participant level data. However, possible confounding factors were controlled with (1) inclusion criteria described above and (2) use of adjusted OR.

It was next planned to describe possible bias within and across studies according to Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation (GRADE) Working Group guidelines²⁶. A three levels scale was used to describe remaining bias such as source populations of cases and controls, exposure assessment, confounding factors and funding. These three levels of bias risk, respectively low, unclear and high, refer to plausible bias that are respectively unlikely, likely and seriously associated with weakening of the final results (levels are defined in Table S1). Again, bias risks were evaluated independently (AF and NV) and disagreements resolved by consensus or external review (OH and EG). Correspondence analysis was used to describe the distribution of levels of risk of bias between studies²⁷.

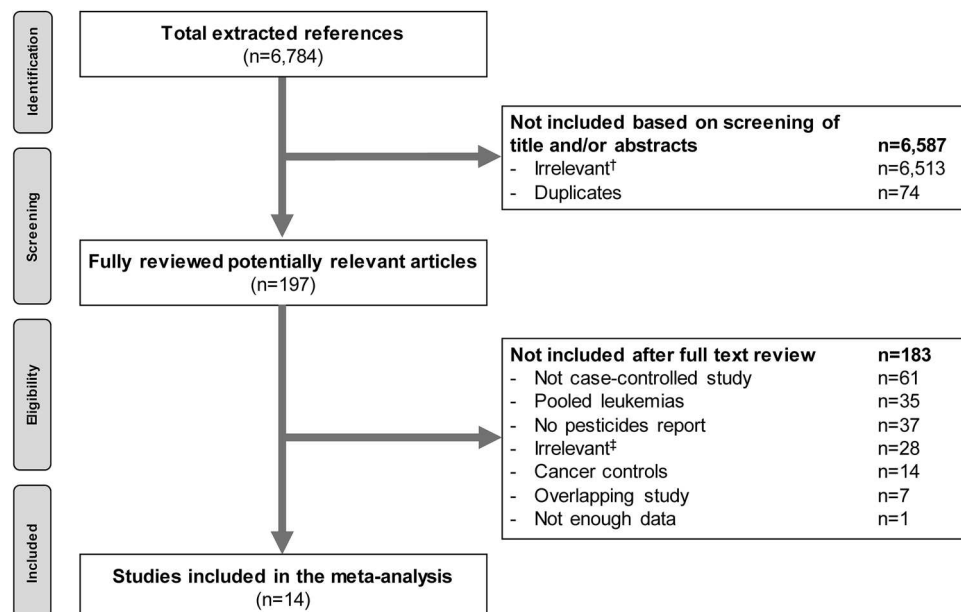


Figure 1. Flow diagram of study selection. [†]in vitro/in vivo studies, case reports, non-English publications, cohort description, non-acute myeloid leukemia (AML) patients, pooled analysis of different leukemia subtypes. [‡]in vitro studies, reviews, case report, erratum, conference paper, death as outcome, missing data on the outcome and exposure, non-AML patients. References are available in Supplementary Datasets 1 and 2.

Data synthesis and statistical analyses. Studies characteristics are reported with descriptive statistics. Considering the differences of studied populations and methods of exposure assessment that yielded heterogeneity, the DerSimonian and Laird random effects model was used²⁸. Data were summarized by the number of individuals exposed or not to pesticides, with or without AML. The association was quantified using OR with a 95% confidence interval. Adjusted OR and 95%CI from each study were preferred. If unreported, unadjusted OR and 95%CI with the reported number of exposed and non-exposed cases and controls were calculated. For the final analysis, OR and standard error of OR were used. Cochrane's Review Manager calculator was used for OR and standard error calculations²⁹. Statistical analyses were performed by NV and FP with the “metafor” package²⁸ of the R software (v3.4.0)³⁰.

Sensitivity analysis. To evaluate the stability of the results, a sensitivity analysis was conducted by sequential omission of each study and inclusion of alternative OR analyses when present. A time-dependent cumulative analysis was performed.

Publication bias. Publication bias were assessed graphically with funnel plots to highlight asymmetry and with Egger's test³¹. A trim-and-fill analysis was performed in case of suspected asymmetry in order to correct the OR using R_0 , L_0 and Q_0 estimators³². This method imputes hypothetical unpublished studies to mirror those published and calculates an adjusted OR to assess the impact of these hypothetical missing studies on the pooled estimate.

Subgroup analysis. To identify which main sources of factors influenced the final OR, subgroup analyses was performed. Subgroups were defined from study design (AML population, control population, NOS score, source of bias), pesticide exposure recording methods (exposure assessment, job exposure matrix or expert review), confounding factors analyses (matched, adjusted OR), studied population (geographical zone, AML type, time period) and pesticide subtypes as reported in included studies.

Results

Literature search and eligibility. The search strategy identified 6,784 references. After abstracts assessment, 197 references were retained. Full text review finally excluded 183 references. Therefore, 14 studies were included in the meta-analysis (Fig. 1)^{33–46}.

Study characteristics. The main characteristics of the 14 studies are reported on Table 1. Inclusion periods were heterogeneous as illustrated in Fig S1. The median duration of inclusions was 4 years (range: 1–17).

The meta-analysis ultimately included 3,955 AML patients and 9,948 controls. The main source of AML patients was multicentric (n = 11). Five studies reported only de novo AML. One reported 0.69% of secondary AML (sAML). The other studies (n = 8) did not report whether the AML were de novo, sAML or therapy-related

First author	Year	Country	Inclusion periods	Gender	Inclusion age	AML source ^a	Controls source ^a	Matching criteria	Adjusted OR ^b	No. AML	No. controls	Exposure ^c	Quality score (/9) ^d
Flodin U ³³	1986	Sweden	1977–1982	M/F	20–70	Multicentric	Population	Age, gender, residency	No	59	354	SAQ	4
Richardson S ³⁴	1992	France	1984–1988	M/F	> 30	Multicentric	Hospital	Age, gender, ethnicity, residency	Yes	154	513	PTP	8
Crane MM ³⁵	1992	USA	1982–1983	M/F	> 18	Multicentric	Hospital	Age, gender, ethnicity, year of inclusion	No	60	60	PTP	7
Ciccone G ³⁶	1993	Italy	1989–1990	M/F	15–74	Monocentric	Hospital and population	Age, gender	Yes	50	246	PTP	6
Mele A ³⁷	1994	Italy	1986–1990	M/F	> 15	Multicentric	Hospital	NS	Yes	252	1,161	PTP	4
Albin M ³⁸	2000	Sweden	1976–1993	M/F	> 20	Multicentric	Population	Age, gender, residency	No	372	351	PTP	6
Lazarov D ³⁹	2000	UK, Yugoslavia	1986–1994	M/F	> 18	Multicentric	Hospital	Age, gender, year of inclusion	No	98	196	PTP	7
Adegoke OJ ⁴⁰	2003	China	1987–1989	M/F	> 15	Multicentric	Population	Age, gender	Yes	236	502	PTP	6
Terry PD ⁴¹	2005	USA, Canada	1986–1989	M/F	17–79	Multicentric	Population	Age, gender, ethnicity, residency	Yes	599	607	PTP	6
Kaufman DW ⁴²	2009	Thailand	1997–2003	M/F	> 18	Monocentric	Hospital	Age, gender, residency	Yes	87	756	PTP	7
Wong O ⁴³	2010	China	2003–2007	M/F	> 18	Multicentric	Hospital	Age, gender, hospital	No	722	1,444	PTP	8
Strom SS ⁴⁴	2012	USA	2003–2007	M/F	18–80	Monocentric	Population	Age, gender, ethnicity, residency	No	638	636	PTP	8
Parodi S ⁴⁵	2017	Italy	1990–1993	M/F	20–74	Multicentric	Population	Age, gender	No	223	1,774	PTP	7
Poynter JN ⁴⁶	2017	USA	2005–2010	M/F	20–79	Multicentric	Population	Age	Yes	405	1,348	SAQ	6

Table 1. Main characteristics of case–control studies included in the meta-analysis evaluating the association of AML and pesticide exposure. ^aAcute myeloid leukemia (AML) patients and controls source are described in Table S3; ^bAdjustment variables are fully described in Table S6; ^cPesticide exposure methods are fully described in Table S2; ^dQuality score was evaluated with the Newcastle–Ottawa scale for case–control studies (Table S4). NS: not specified; PTP: person-to-person interview; SAQ: self-administered questionnaire; OR: odds ratio.

(tAML). Age at inclusion was heterogeneous but most patients were between 40 and 75 years-old (Fig S2). Control cohorts were hospital-based ($n = 5$ studies), general population-based ($n = 8$) or both ($n = 1$). AML patients and controls were matched in all but one study. Reported matching criteria were age ($n = 13$ studies), gender ($n = 11$), residency ($n = 5$), ethnicity ($n = 4$), year of inclusion ($n = 2$) and hospital ($n = 1$) (Table 1).

Exposure was evaluated through self-administered questionnaires in two studies, while twelve used peer-to-peer interviews (Table 1 and Table S2). In addition, six studies evaluated the probability of OPE with expert reviews or job matrix exposure (Table S2). Seven studies were conducted in Europe, four in North America and three in Asia. The median study quality NOS score was 6.5 (range: 4–8) (Table S4). No direct conflict of interest with pesticide industries was disclosed (Table S5).

The total numbers of exposed subjects were at least 563 AML patients and 1,219 controls (excluding one study which did not report these numbers³⁸). Three studies reported alternative OR according to the duration of OPE^{35,40,44}. Seven studies that reported adjusted OR and adjusted covariates are depicted in Table S6^{34,36,37,40–42,46}. Only four studies specified OR for the types of pesticides (herbicides $n = 4$; insecticides $n = 3$) and two considered the modality of application (fumigants $n = 2$)^{34,37,43,46}. Only one study reported the results of exposure for specific molecules in cases and controls⁴².

Bias study. Plausible bias in the meta-analysis and within each study are summarized in Fig. 2 and Fig S3A. Bias were found in AML subtype diagnosis according to cytogenetic or molecular abnormalities. Pesticides

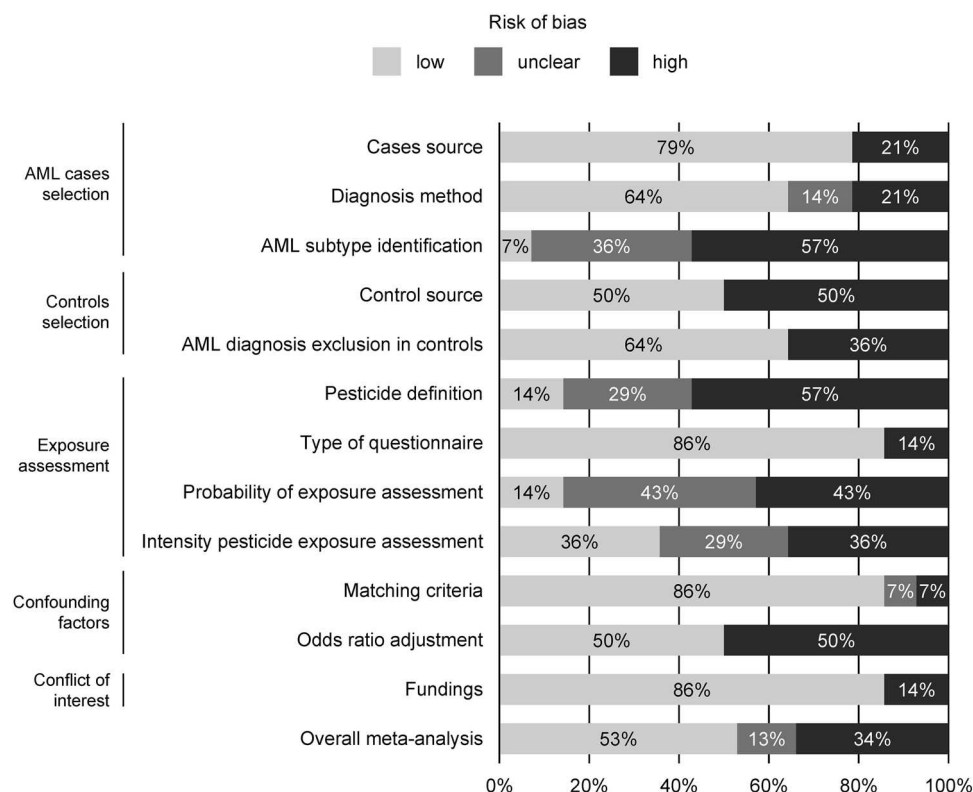


Figure 2. Risk of bias across studies assessed following Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation (GRADE) Working Group guidelines. Low, unclear and high, refer to plausible bias that are respectively unlikely, likely and seriously associated with weakening of the final results (defined in Table S1). Results in individual studies are reported in Fig S3.

definition was classified as unclear or high source of bias in 29% and 57% of studies. The intensity of pesticide exposure was also poorly described.

In correspondence analysis, dimension 1 was driven by unclear and high risk of bias (76% and 24%) while low risk of bias contributed to 48% of dimension 2. Four studies were associated with a higher rate of high risk^{33,35,37,45}. Using the distribution of studies in the second dimension, six studies were identified as associated with lower risk of bias^{34,40,42–44,46} (Fig S3B).

Risk estimation. Using a random effects model, the overall analysis showed a significant adverse association between OPE and AML with OR=1.51 (95%CI: 1.10–2.08) (Fig. 3), and a significant heterogeneity between studies ($I^2=76\%$, $p<0.001$).

Sensitivity analyses and time-dependent meta-analysis. None of the studies was identified as outlier by Q-Q plot (Fig S4). Sequential one-by-one exclusion of the studies did not influence the overall estimate. OR ranged from 1.32 (95%CI: 1.01–1.71) to 1.61 (95%CI: 1.15–2.25) (Fig. 4A). When the studies were added chronologically by publication date, the 95%CI narrowed progressively and became significant from 2010 on (Fig. 4B). Using alternative lower OR, the overall estimate remained statistically significant (OR=1.40 [95%CI: 1.06–1.86]).

One screened but not included study reported individual OR according to plasmatic levels of organochlorines-derived-metabolites. It was not eligible for inclusion in this meta-analysis because of lack of individual data to calculate the overall OR (Fig. 1)⁴⁷. Nevertheless, due to the objective biological assessment of pesticide exposure used in this publication, we calculated the impact of individual OR on the results of our meta-analysis. OR remained statistically significant, ranging from 1.44 (95%CI: 1.05–1.98) to 1.51 (95%CI: 1.10–2.08) (Table S6 and S7).

Publication bias. Even though the Egger's test was not statistically significant ($p=0.95$), graphical analysis of the funnel plot revealed an asymmetry that suggested a publication bias (Fig. 5). Using L_0 and Q_0 estimators, trim-and-fill analysis imputed studies in order to correct the OR (OR=1.83 [95%CI: 1.32–2.53]). The R_0 estimator did not identify the studies that could be imputed (Figs. 1, 5).

Stratified analysis. All studies were stratified to explore factors influencing overall OR (Fig. 6 and Table S8). This stratified analysis showed that the association between OPE and AML was notably stronger in studies with

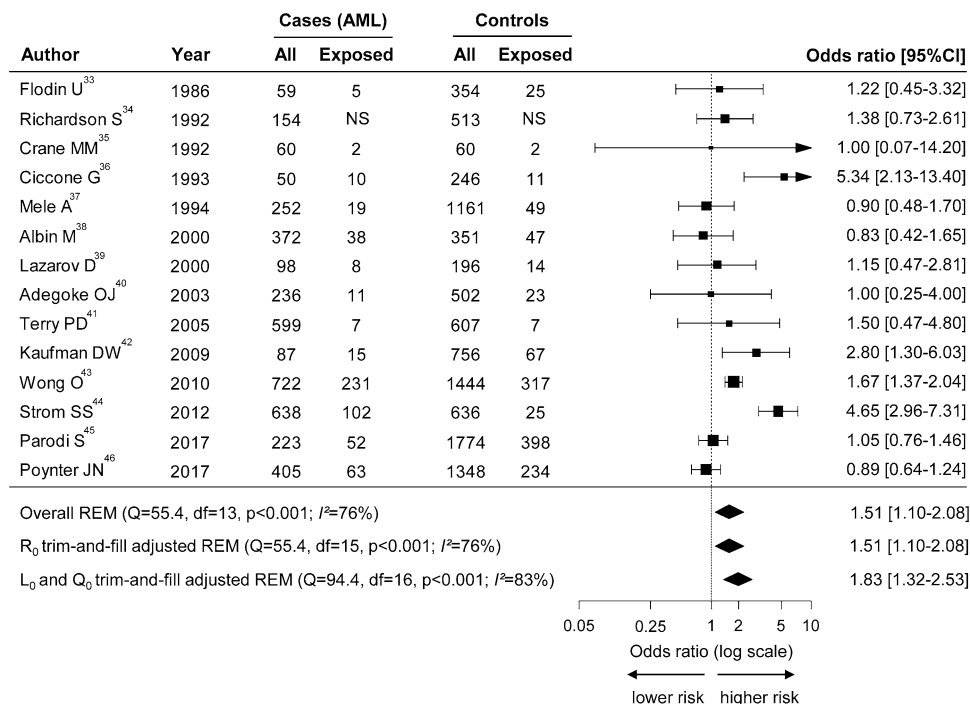


Figure 3. Forest plot illustrating the overall significant increase of acute myeloid leukemia (AML) risk in populations exposed to occupational pesticides. The overall cumulative analysis was calculated with adjusted odds ratio (OR) whenever available, using the random effect model (REM). Pesticide exposure had to be clearly stated in each study, its definition being reported in Table S2. Matching and adjustments strategies are reported in Table 1 and Table S6. Squares indicate the OR for each study, solid diamonds show the pooled meta-analysis estimates and error bars are defined as the 95% confidence interval (95%CI). The size of squares correlates to the weight of each study in the meta-analysis. Publication bias adjustments using trim-and-fill methodology are reported below the overall REM. Imputed analyses are shown in Fig. 5. Q: Cochran Q-test, df: degree of freedom; p: p value of the heterogeneity test; NS: not specified; superscript numbers correspond to the list of references. This figure was performed using R software³⁰ with the “metafor” package²⁸.

(1) monocentric AML patients and hospital-bases control population (2) NOS > 6 and the group of studies identified as those with lowest risk, (3) exposure assessment through peer-to-peer interview, (4) diagnosis in North America and Asia and after 1995, (5) restriction to de novo AML. Regarding the type of pesticide, when known, the association between OPE and AML was significant with insecticides (OR = 1.45 [95%CI: 1.16–1.81]). Strata of adjusted and non-adjusted OR studies were similar.

Quality of evidence. According to GRADE approach, quality of evidence (QoE) reflects the confidence that an estimate effect is close to the observed effect²⁶. QoE can be categorized in four grades: very low (very little confidence), low (limited confidence), moderate (moderately confidence), high (very confident). The GRADE approach to rating the QoE begins with the study design. Since GRADE guidelines²⁶ were designed for interventional studies, it must be adapted to observational studies, such as human health impacts of environmental exposure. In this context, the level of evidence of case-control studies can be defined as moderate, just after prospective cohort studies which present the highest level of evidence. The next step was to study the factors modulating QoE. Heterogeneity (I² = 76%), indirectness of evidence (due to the use of standardized questionnaires), imprecision and bias across studies could decrease the certainty of evidence to a lower level. This is counterbalanced by higher OR in studies with lower risk of bias or with higher quality score, by publication bias underestimating the OR, and by the large effect calculated. Consequently, the overall certainty of evidence of this meta-analysis can be considered as moderate (Table 2).

Discussion

Knowledge about the impact of OPE on cancer risk is a major societal concern. There are increased evidences of the association of hematological lymphoid malignancies and OPE, but little is known regarding AML. This meta-analysis of highly selected case-control studies similarly demonstrates an adverse association between OPE and the risk of developing AML.

Observational cohort studies prospectively collect exposure data conversely to case-control studies in which data are retrospectively collected. Because of this, recall bias is inherent to the design of case-control studies⁴⁸, notably in case of occupational exposure, which requires the participant to recall the details of many years of employment. Nevertheless, when considering occupational risk, individuals usually have a good memory of the

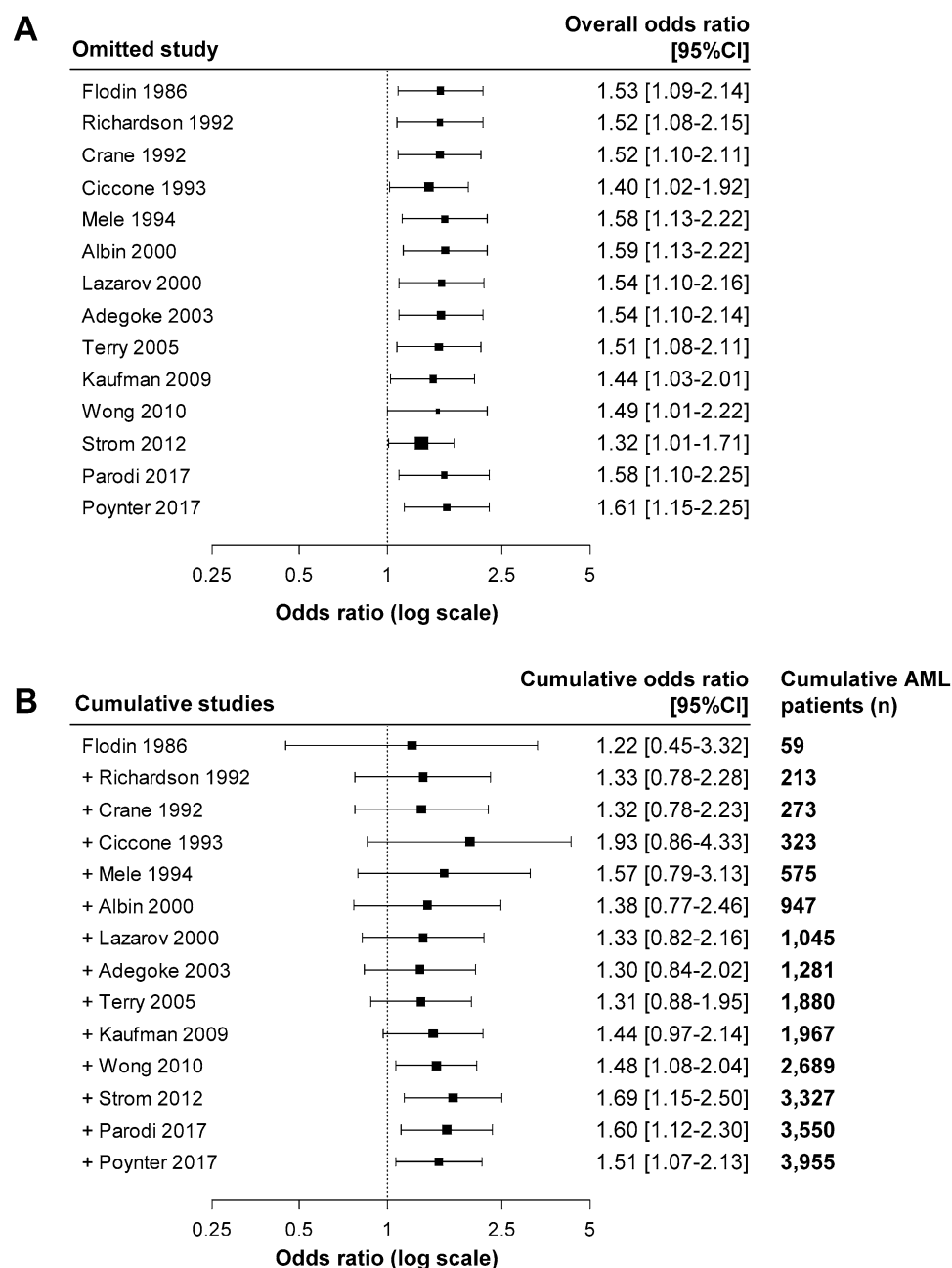


Figure 4. Sensitivity and time-dependent cumulative analyses. **(A)** Sensitivity analysis by sequential omission of every study. Each line refers to the global odds ratio (OR) after excluding the corresponding study. In all cases, the OR is statistically significantly in favor of a risk of developing acute myeloid leukemia (AML) related to occupational pesticide exposure (OPE). **(B)** Time-dependent analyses after adding each study down to the full 14 publications. The OR, in favor of AML risk related to OPE, becomes statistically significant after the cumulative inclusion of 2,689 patients (from Wong O et al.). This figure was performed using R software³⁰ with the “metafor” package²⁸.

jobs carried out during their lifetime, even if they are not able to remember the details and specifications of all the pesticides they used. Moreover, the risk of recall bias is reduced with the use of standardized questionnaires, expert assessment and job exposure matrices. The possible financial benefits, or social factors, associated with the recognition of this risk can potentially lead to either an over- or under-estimation of exposure⁴⁸.

The meta-analysis performed in 2007 by van Maele-Fabry et al. reported an association between OPE and AML in cohort studies but not in case-control studies¹⁸. This may be partly explained by recall bias and also by the inclusion of controls with past history of cancer, which increases the risk of AML (from 1.2-fold for colon cancer up to 19.3-fold for bones and joints malignancies)²⁰. Moreover, identification of patients through death certificates could induce bias due to errors in reporting the diagnosis of AML²¹. Our aim was to avoid these biases by only selecting studies without these characteristics.

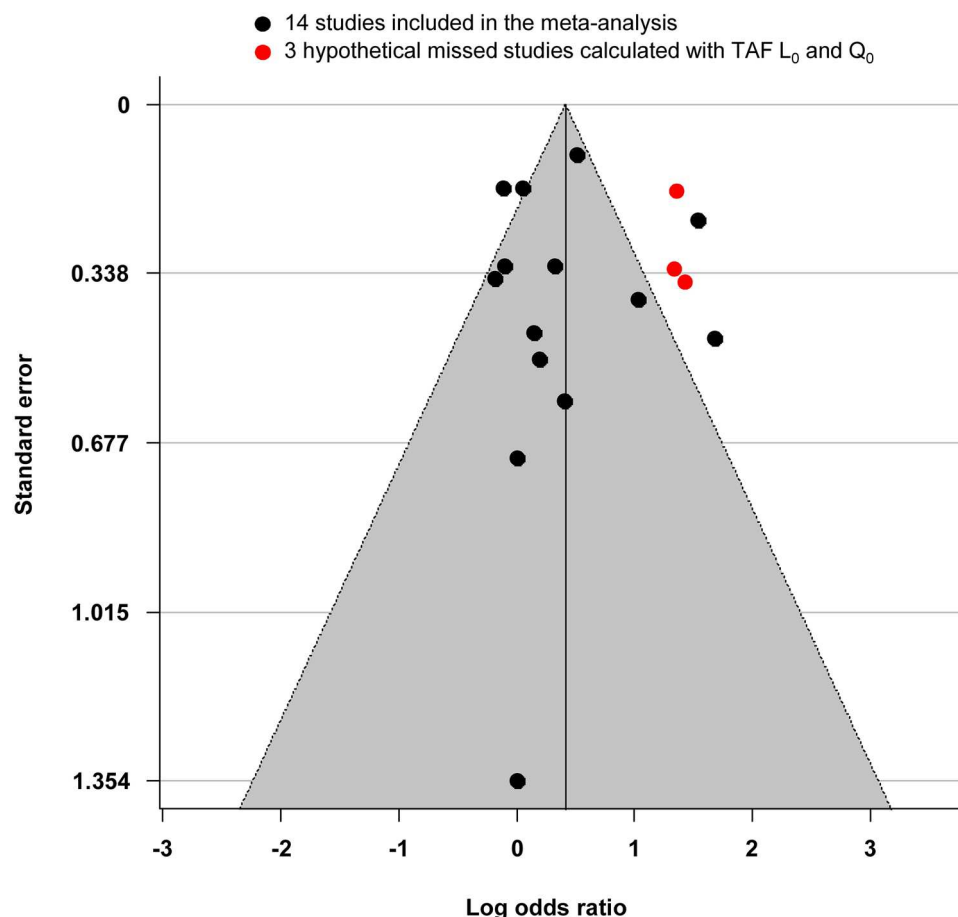


Figure 5. Funnel plot illustrating publication bias analysis. Logarithmic risk estimates are plotted against the standard error for each study. The plot is centered around the overall effect with 95% confidence region estimated effect based on the random effect model. Black circles denote identified studies and their summary measures. Red circles represent missing studies and their hypothetical measures after adjustment for funnel plot asymmetry using trim-and-fill (TAF) L_0 and Q_0 estimators, respectively. R_0 did not identify missing studies. This figure was performed using R software³⁰ with the “metafor” package²⁸.

Expecting to include all studies reporting OPE and AML diagnosis, it was decided to use a broad strategy in order to identify all references published since 1946 containing information about AML incidence and OPE. The keywords used were “pesticides”, “demographics” and “chemicals”. This allowed for the identification of four references not disclosed with only the “pesticides” keyword^{35,38,39,44}. The references identified were compared with those from the 2007 meta-analysis¹⁸.

This method ultimately selected 14 studies of interest from 6,784 literature references. These stringent criteria allowed the inclusion of six studies^{33,34,36,37,40,41} from the previous work¹⁸. Moreover, three unused references published before 2007 were added^{34,35,43}. Finally, 5 new studies published since 2007^{42–46} were included.

Using a random effects model, the overall OR estimate of the meta-analysis was 1.51 (95%CI: 1.10–2.08), pooling adjusted OR (when reported) and unadjusted OR. Interestingly, this result is similar to the OR calculated from cohort studies (OR = 1.55)¹⁷. All studies but one were matched for confounding factors⁴⁰. Seven studies reported adjusted OR for pesticide exposure^{34–37,40–42,46}. Adjusted ORs were added to the final model to limit the risk of bias with potential confounding factors. However, in subgroup analysis, there were no differences in OR between adjusted and unadjusted studies.

The quantitative graphical heterogeneity identified in the Forest plot was confirmed by the heterogeneity test ($I^2 = 76\%$). This could be explained by (i) different geographical zones studied, (ii) heterogeneous inclusion periods (ranging from 1976 to 2010), (iii) study design (matching criteria, adjustment covariates, source of AML patients and controls), (iv) patient characteristics, notably age ranging from 15 to over 75 years old and v) OPE assessment methods.

The stability of the overall OR was checked by (1) sequential exclusion, which did not show major influence from any single study, (2) an alternative model with lower exposure intensities reported ORs which did not influence the overall OR. Moreover, adding individual OR of pesticides-derived metabolites as recently reported by Bassig et al.⁴⁷ did not influence the results.

In time-dependent cumulative analyses, it appeared that OR became significant from 2010 on, when the study by Wong et al.⁴³ was added, possibly explaining the lack of association between AML and OPE in case-control

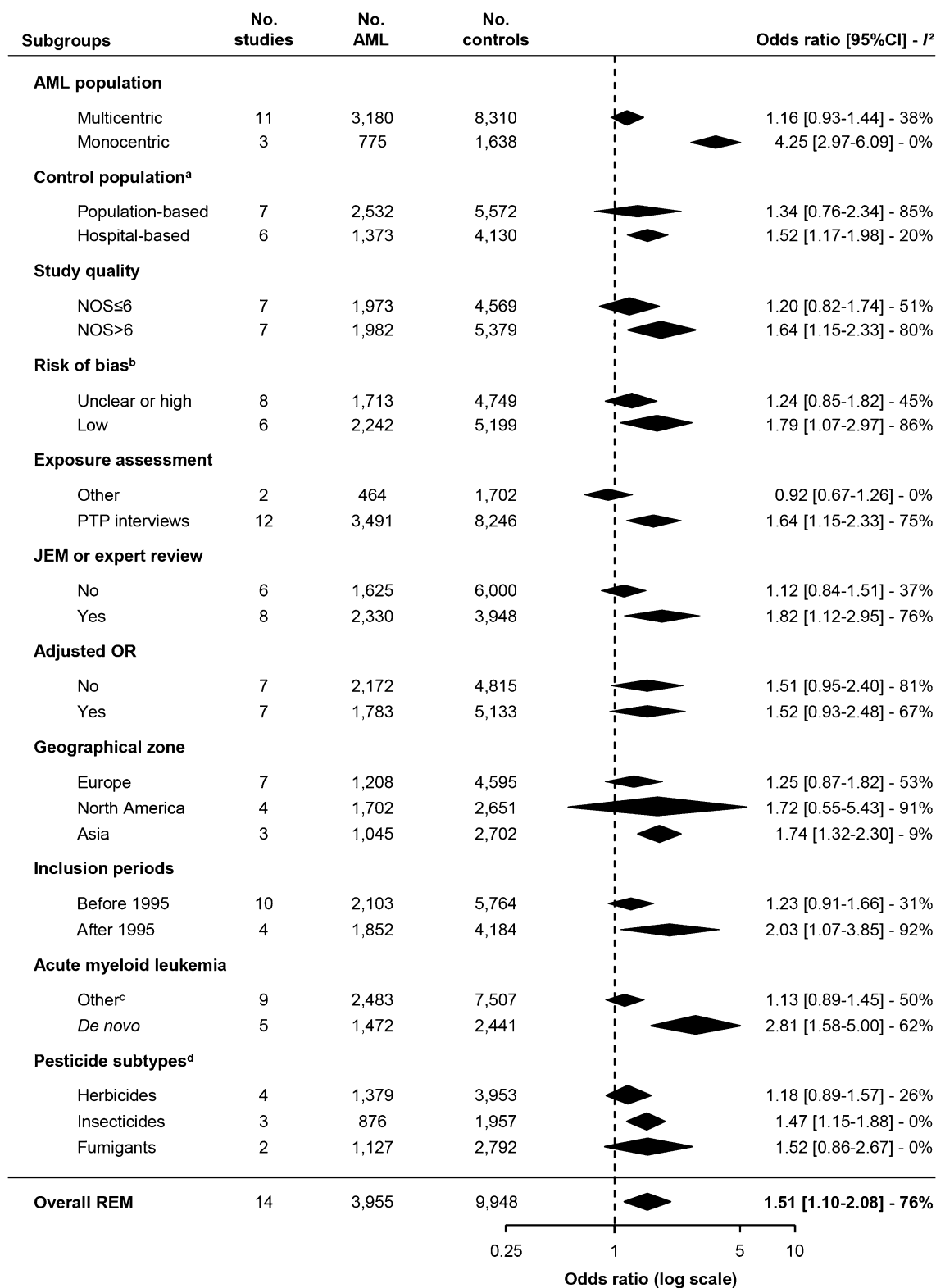


Figure 6. Forest plot illustrating the risk estimates and their 95% confidence intervals (95%CI) within subgroups of included studies. Subgroups are presented in ascending order according to their mean effects. The center and width of diamonds represent mean OR and 95%CI. Heterogeneity within each stratus is reported with I^2 . ^aCicconne et al.³⁶ not included: hospital- and population-based; ^brisk of bias classification was performed using correspondence analysis described in Fig S3; ^cother: de novo status was not mentioned or 0.69% of secondary acute myeloid leukemia (sAML) in Wong et al.⁴³; ^donly studies reporting specific pesticide exposure were included for this subset analysis. NOS: Newcastle–Ottawa scale; PTP: peer-to-peer interviews. Description of articles and number of subjects included in each stratus are shown in Table S8. This figure was performed using R software³⁰ with the “metafor” package²⁸.

Outcome	No. participants (studies)	Overall inclusion periods	Geographical zone	Quality of evidence	OR (95%CI)
AML diagnosis	13,903 (14)	1976 to 2010	Europe (Sweden, France, Italy, United Kingdom, Yugoslavia) North America (USA, Canada) Asia (China, Thailand)	⊕⊕⊕○ Moderate	1.51 (1.10–2.08)

Table 2. GRADE summary of findings table.

studies reported by van Maele-Fabry et al.¹⁸ which appeared before this publication. However, this should not be interpreted as an increase in AML risk with increased pesticide use over the years, considering that the date of publication does not reflect the period of inclusion. Indeed, one of the five reports published after 2009 included patients from the period 1990–2000⁴⁵.

No publication bias was found using Egger’s test. However, this test is low-powered in moderate bias identification³¹ and graphical analysis indeed contrarily suggested a publication bias with a higher number of references on the left side of the funnel plot. A trim-and-fill method was used to explore the potential effects of missed studies that impacted funnel plot symmetry³². Two estimators calculated an overall bias-corrected OR by adding dummy studies so that funnel plot symmetry was reached. Furthermore, studies reporting pesticides exposure as subgroups not identified in the title, abstract or keywords might have been missed with our strategy.

The overall quality of selected studies was illustrated and compared in a standardized way by using NOS²³. Twelve studies ranked between 6 and 8, suggesting that most of the included references followed recommendations on the report of case–control studies. In subgroup analyses, these highly ranked references showed a higher OR (1.80 vs. 1.20). Even if this scale suffers from potential variability, it was under control with the independent reviewing of each study by two of the authors, followed by consensus²⁴. Knowing the limits of NOS, we elected to include all studies although NOS scores varied from 4 to 8. The impact of study quality based on NOS was then evaluated in the stratified analysis which confirmed that the subgroup with a higher NOS also had a higher OR (1.80 vs. 1.20). NOS is a generic tool for assessing the overall methodology quality. We thus described three levels of plausible bias respectively from the cases, controls and exposure assessment and in confounding factors within each. Six studies were identified that were more likely to be associated with a lower risk of bias and for which the OR was higher than in the eight others (2.03 vs. 1.03)^{34,40,42–44,46}. These results suggest that the association between OPE and AML observed in this meta-analysis is partly driven by studies with lower bias and higher quality.

The types of AML (de novo, sAML or tAML) were also extracted during the full review process. They were reported in six studies, five having included only de novo AML^{36,39,41,42,44}, and the last one 99% and 1% of de novo and sAML, respectively⁴³. The association with OPE appeared to be stronger in de novo AML studies than in others (OR = 2.81 vs. OR = 1.13, respectively). In order to estimate the frequency of sAML in all included references, the age at inclusion was extracted. Most patients were between 40 and 75 years of age. Five studies included patients over 75 years-old (representing a minority of the population included)^{37,40–42,46} while three studies included some patients below the age of 18 (minimum 15 years-old)^{37,40,41}. It is established that the median age at transformation ranges between 62 and 64 years old in MDS-sAML and non-MDS-sAML⁴⁹. Thus, we can postulate that the populations studied may have included sAML or tAML; even if not specified. Previous MDS in included patients was not mentioned in the references retained. Since MDS may evolve to AML, the association between AML and OPE probably also takes into account the OPE-induced risk of MDS¹⁷.

Extracted data on AML types are further limited since data concerning OPE and molecular findings in AML were not reported. Older studies compared cytogenetic abnormalities in exposed and non-exposed patients but none found any significant impact of an abnormal karyotype nor abnormalities of chromosomes 5 or 7^{35,36,50}. However, these studies described small cohorts.

The source of patients and controls may be a cause of bias to properly estimate the risk of OPE-related AML. AML patients were mainly from multicentric studies (n = 11 studies), while control sources were hospital- and population-based (n = 5 and n = 8, respectively). The comorbidities of control patients from hospitals may influence AML incidence. Moreover, cities and geographical zones may impact on the access to hospital (notably university hospitals) and consultation rate. By considering geographical zone subgroups, the highest association between OPE and AML risk was observed in Asia, followed by North America and Europe. This result could be explained by a higher usage of pesticides in Asia and the USA, compared to European countries¹. Likewise, the population included after 1995 was associated with a significantly higher OR (2.03 vs. 1.23) which may reflect the increase on pesticide usage since the 90’s¹.

OPE assessment was evaluated through self-administered questionnaires or peer-to-peer interviews. Seven studies controlled self-reported assessments by expert review (n = 5)^{34–36,38,39} or job-exposure matrices (n = 2)^{40,44} which may improve the accuracy of exposure classification. In subgroup analysis, the association between OPE and AML was stronger using publications reporting peer-to-peer interviews (1.64 vs. 0.92) and matrix or expert consensus (1.82 vs. 1.12). As suggested by the bias analysis, pesticide definition was poorly described in the studies included. The WHO defines pesticides as “chemical compound(s) used to kill pests including insects, rodents, fungi and unwanted plants”⁵¹. This definition refers to the function of these products and is insufficient regarding the vast number of molecules, their mechanisms of action and their application methods². Additionally, adjuvants in pesticides are generally declared to be inert, but have been indicated to amplify the toxicity of the active ingredient⁵². Four studies specified pesticides as their different categories (herbicides, insecticides, etc.) while others did not provide any precise definition of pesticides^{34,37,43,46}. Only one study reported the details on these molecules⁴². The way in which pesticides are used is also a factor to consider in the risk of AML, since subgroup analysis using the mode of pesticides exposure revealed a stronger association between OPE to fumigants and

AML (OR = 1.52). The type of pesticides is also probably important to consider, since it has been reported that insecticide exposure is associated with an increased risk of MDS (OR = 1.71; 95%CI: 1.22–2.40)¹⁷.

High and unclear overall risks of bias were estimated at 40% and 14% following the GRADE method, respectively²⁶. Because the GRADE approach is well-suited for clinical studies which evaluate pharmacological or technical treatment intervention but not environmental studies, we adapted GRADE criteria to the context of this meta-analysis in order to objectively assess the risk of bias⁵³. When considering QoE assessment, the same approach was used. The factors decreasing QoE, such as heterogeneity and indirectness were counterbalanced by those increasing it such as higher OR in studies with lower risk of bias. Following this approach, the quality of evidence was estimated as moderate: “the true effect is likely to be close to the estimate of the effect, but there is a possibility that it is substantially different”²⁶.

Even if an association between OPE and AML is demonstrated by this meta-analysis, the causal interpretation should be formulated with caution. The selected studies reported OR with uncontrolled confounding factors between controls and AML patients, since AML characteristics and risk factors are poorly reported in studies investigating the relationship between AML and OPE^{3,15,25}, as already observed in the previous meta-analysis¹⁸. Likewise, dose–response links are critical information to discuss causality. Here, exposure doses were only reported in three references^{35,40,44}. Among these, one observed a higher risk of AML in the highly exposed group⁴⁴. In stratified analysis, OR was higher in North American and Asian population as well as in inclusion periods after 1995. This result may also support a dose–relation effect considering that pesticides usage is higher in these populations (Fig S5)².

Conclusions

In lymphoid malignancies, a higher rate of non-Hodgkin's lymphomas (NHL) was first described among farmers, then cohort and case–control studies confirmed and described the specific association between pesticides molecules families and an increased risk of NHL^{5,6,8}. To date, such data on specific molecules have not been reported in AML. By performing a meta-analysis with highly selected case–control studies, we report here on a documented adverse association between OPE and AML risk. This result reinforces the results of cohort studies published 12 years ago and is a new argument to consider AML as an occupational illness in patients with demonstrated OPE. As for lymphoid diseases, further studies will have to focus on the biological effects of individual pesticides and agricultural cocktails, in order to determine how these molecules are involved in leukemogenesis.

Data availability

All published data collected during the systematic review are available in this publication and its supplementary information files.

Received: 12 May 2020; Accepted: 6 January 2021

Published online: 21 January 2021

References

1. FAO (Food & Agriculture Organization), <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize> (Accessed: April 4, 2018).
2. Pesticide Action Network, North America, PAN Pesticide Database, <http://www.pesticideinfo.org> (Accessed: April 4, 2019).
3. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
4. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **19**(127), 2375–2390 (2016).
5. Blair, A. & Zahm, S. H. Agricultural exposures and cancer. *Environ. Health Perspect.* **103**, 205–208 (1995).
6. De Roos, A. J. *et al.* Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup. Environ. Med.* **60**, E11 (2003).
7. Fritschi, L. *et al.* Occupational exposure to pesticides and risk of Non-Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 849–857 (2005).
8. Leon, M. E. *et al.* Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *Int. J. Epidemiol.* **48**, 1519–1535 (2019).
9. Lynch, S.M., Mahajan, R., Beane Freeman, L.E., Hoppin, J.A. & Alavanja, M.C. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to butylate in the Agricultural Health Study AHS. *Environ. Res* **109**, 860–868 (2009).
10. Zheng, T. *et al.* Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma. *J. Occup. Environ. Med.* **43**, 641–649 (2001).
11. Lamure, S. *et al.* Association of occupational pesticide exposure with immunochemotherapy response and survival among patients with diffuse large B-cell lymphoma. *JAMA New Open* **2**, e192093 (2019).
12. Viel, J. F. & Richardson, S. Adult leukemia and farm practices: an alternative approach for assessing geographical pesticide exposure. *Soc. Sci. Med.* **32**, 1067–1073 (1991).
13. Sperati, A. *et al.* Mortality among male licensed pesticide users and their wives. *Am. J. Ind. Med.* **36**, 142–146 (1999).
14. Kristensen, P., Andersen, A., Irgens, L. M., Laake, P. & Bye, A. S. Incidence and risk factors of cancer among men and women in Norwegian agriculture. *Scand. J. Work Environ. Health* **22**, 14–26 (1996).
15. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
16. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html> (Accessed: April 4, 2018).
17. Jin, J. *et al.* Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: A meta-analysis based on 1,942 cases and 5,359 controls. *PLoS ONE* **9**, e110850 (2014).
18. Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S. & Lison, D. A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure. *Cancer Causes Control* **18**, 457–478 (2007).
19. Schulz, K. F. & Grimes, D. A. Case-control studies: research in reverse. *Lancet* **359**, 431–434 (2002).
20. Morton, L. M. *et al.* Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975–2008. *Blood* **12**, 2996–3004 (2013).

21. Johansson, L. A. & Westerling, R. Comparing Swedish hospital discharge records with death certificates: implications for mortality statistics. *Int. J. Epidemiol.* **29**, 495–502 (2000).
22. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D.G., PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* **62**, 1006–10012 (2009).
23. Wells, G.A. *et al.* The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality if nonrandomized studies in meta-analyses, http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp (Accessed: August 2, 2018).
24. Stang, A. Critical evaluation of the Newcastle–Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. *Eur. J. Epidemiol.* **25**, 603–605 (2010).
25. Deschler, B. & Lübbert, M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer* **107**, 2099–2107 (2006).
26. Schünemann, H., Brożek, J., Guyatt, G. & Oxman, A. *GRADE Handbook, Cochrane Training*. <http://www.training.cochrane.org/resource/grade-handbook>. (Accessed: January 2, 2019).
27. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw.* **25**, 1–18. <http://www.jstatsoft.org/v25/i01>. (Accessed: January 2, 2019) (2008).
28. Viechtbauer, W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J. Stat. Softw.* **36**, 1–48 (2010).
29. Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration (2014).
30. R Core Team. R: A Language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org> (2017).
31. Sterne, J. A. C., Gavaghan, D. & Egger, M. Publication and related bias in meta-analysis: Power of statistical tests and prevalence in the literature. *J Clin. Epidemiol.* **53**, 1119–1129 (2000).
32. Shi, L. & Lin, L. The trim-and- fill method for publication bias: practical guidelines and recommendations based on a large database of meta-analyses. *Medicine* **98**, e15987 (2019).
33. Flodin, U., Fredriksson, M., Persson, B., Hardell, L. & Axelsson, O. Background radiation, electrical work, and some other exposures associated with acute myeloid leukemia in a case-referent study. *Arch. Environ. Health* **41**, 77–84 (1986).
34. Richardson, S. *et al.* Occupational risk factors for acute leukaemia: a case-control study. *Int. J. Epidemiol.* **21**, 1063–1073 (1992).
35. Crane, M. M., Annegers, J. F., Godwin, J. E. & Keating, M. J. Is histological subtype a marker for environmental exposures in acute myelogenous leukemia?. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **1**, 183–188 (1992).
36. Ciccone, G. *et al.* Myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes: Chemical exposure, histologic subtype and cytogenetics in a case-control study. *Cancer Genet. Cytogenet.* **68**, 135–139 (1993).
37. Mele, A. *et al.* Hair dye use and other risk factors for leukemia and pre-leukemia: a case-control study. Italian Leukemia Study Group. *Am. J. Epidemiol.* **139**, 609–619 (1994).
38. Albin, M. *et al.* Acute myeloid leukemia and clonal chromosome aberrations in relation to past exposure to organic solvents. *Scand. J. Work Environ. Health* **26**, 482–491 (2000).
39. Lazarov, D., Waldron, H. A. & Pejin, D. Acute myeloid leukaemia and exposure to organic solvents—a case-control study. *Eur. J. Epidemiol.* **16**, 295–301 (2000).
40. Adegoke, O. J. *et al.* Occupational history and exposure and the risk of adult leukemia in Shanghai. *Ann. Epidemiol.* **13**, 485–494 (2003).
41. Terry, P. D., Shore, D. L., Rauscher, G. H. & Sandler, D. P. Occupation, hobbies, and acute leukemia in adults. *Leuk Res.* **29**, 1117–1130 (2005).
42. Kaufman, D. W., Anderson, T. E. & Issaragrisil, S. Risk factors for leukemia in Thailand. *Ann. Hematol.* **88**, 1079–1088 (2009).
43. Wong, O., Harris, F., Armstrong, T. W. & Hua, F. A hospital-based case-control study of acute myeloid leukemia in Shanghai: Analysis of environmental and occupational risk factors by subtypes of the WHO classification. *Chem. Biol. Interact.* **184**, 112–128 (2010).
44. Strom, S. S., Oum, R., Elhor Gbitto, K. Y., Garcia-Manero, G. & Yamamura, Y. De novo acute myeloid leukemia risk factors. *Cancer* **118**, 4589–4596 (2012).
45. Parodi, S. *et al.* Coffee and tea consumption and risk of leukaemia in an adult population: A reanalysis of the Italian multicentre case-control study. *Cancer Epidemiol.* **47**, 81–87 (2017).
46. Poynter, J. N. *et al.* Chemical exposures and risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in a population-based study. *Int. J. Cancer* **140**, 23–33 (2017).
47. Bassig, B. A. *et al.* Pre-diagnostic serum concentrations of organochlorines and risk of acute myeloid leukemia: A nested case-control study in the Norwegian Janus Serum Bank Cohort. *Environ. Int.* **125**, 229–235 (2019).
48. Coughlin, S. S. Recall bias in epidemiologic studies. *J. Clin. Epidemiol.* **43**, 87–91 (1990).
49. Granfeldt Östgård, L. S. *et al.* Epidemiology and clinical significance of secondary and therapy-related acute myeloid leukemia: A national population-based cohort study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3641–3649 (2015).
50. Cuneo, A. *et al.* Morphologic, immunologic and cytogenetic studies in acute myeloid leukemia following occupational exposure to pesticides and organic solvents. *Leuk. Res.* **16**, 789–796 (1992).
51. World Health Organization. <http://www.who.int/topics/pesticides/en>. (Accessed: April 2, 2018).
52. Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *Biomed Res Int.* **2014**, 179691 (2014).
53. Morgan, L. R., *et al.* GRADE: Assessing the quality of evidence in environmental and occupational health. *Environ. Int.* **92–93**, 611–616 (2016).

Acknowledgements

The authors would like to thank the Canceropole Grand-Ouest, the International Rotary Club of Blois, “Les Sapins de l’Espoir Contre le Cancer” and CANCEC associations.

Author contributions

A.F. and N.V. performed the research and data analysis, and wrote the manuscript. N.V. and F.P. performed the statistical analyses. M.C.B. analyzed the results and edited the manuscript. N.R. and E.G. analyzed the results. O.H. designed and supervised the study, analyzed the results and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81604-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to O.H.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case-control studies including 3,955 cases and 9,948 controls

Amelie Foucault, Nicolas Vallet, Noemie Ravalet, Frédéric Picou, Marie C Bene, Emmanuel Gyan, and Olivier Herault

SUPPLEMENTARY METHODS

Literature search strategy

Extracted data

SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

Table S1. Classification of risk of bias used in this meta-analysis.

Table S2. Details on exposure assessment in included studies.

Table S3. Details on acute myeloid leukemia (AML) patients and control sources.

Table S4. Detailed Newcastle-Ottawa scale evaluation for studies included in the meta-analysis.

Table S5. Reported funding of included studies.

Table S6. Variables included in the final model from the seven studies reporting adjusted odds ratios.

Table S7. Sensitivity analysis including results from the study of Bassig *et al.*

Table S8. Stratified pooled odds ratio of the relationship between pesticide exposure and risk of acute myeloid leukemia.

Fig S1. Inclusion periods and date of publication of included studies in the meta-analysis.

Fig S2. Graphical representation of inclusion age heterogeneity between included studies.

Fig S3. Bias assessment within each study.

Fig S4. Outlier studies identification with Q-Q plot.

Fig S5. Frequency of acute myeloid leukemia over time together with pesticide usage in the USA.

SUPPLEMENTARY METHODS

Literature search strategy

The following search strategies were used: (i) “(acute myeloid leukemia OR myeloid leukemia OR AML OR acute leukaemia) AND (pesticide OR herbicide OR rodenticide OR insecticide OR fungicide OR repellent OR pest)”; (ii) “(acute myeloid leukemia OR myeloid leukemia OR AML OR acute leukaemia) AND (chemicals OR solvents OR organochlorine OR alachlor OR propachlor OR halogenated hydrocarbon OR benzene)”; (iii) “(acute myeloid leukemia OR myeloid leukemia OR AML OR acute leukaemia) AND (occupation OR farmers OR agriculture OR rural)”. To focus on adult populations, for every search we added “NOT (child OR childhood OR children OR infant)”. The spelling “leukaemia” was also used to increase the number of screened references. No language restrictions were placed within the search strategy but only English-language publications were ultimately retained. The references extracted were compared to those of the previously published meta-analysis¹⁸.

Extracted data

The following data were extracted: study quality score (see below), inclusion period, age of included AML patients, country of origin, source of AML patients, source of controls, number of total and exposed AML patients and controls, matching covariates, unadjusted OR, adjusted OR, covariates of adjustment, methods for exposure assessment, pesticides definition, reported funding. Alternative OR for different exposure intensities were also extracted. These items were used for the stratified analysis.

Table S1. Classification of risk of bias used in this meta-analysis.

		Low	Unclear	High
Cases (AML)	Cases source	Multicentric	-	Monocentric
	AML method	WHO or FAB criteria	reviewed by experts	ICD, other or not specified
	AML subtype identification	AML subtype defined with cytogenetic or molecular findings	AML only defined as de novo, secondary or therapy related	other or not specified
Control (non AML)	Source	population	-	hospital
	AML diagnosis exclusion in controls	exclusion AML diagnosis	-	no information on AML diagnosis exclusion
Exposure assessment	Pesticide definition	clear definition with identified molecules	at least one usage or type of pesticides stated in the manuscript (insecticides, rodenticides, etc.)	pesticide definition not specified
	Type of questionnaire	peer to peer interviews	-	other or not specified
	Probability of exposure evaluation	use of job exposure matrix	expert review	other or not specified
	Intensity of pesticide exposure	described	not clear	not specified
Cofounding factors	Matching	matched gender and age	matched gender or age	other or not specified
	Adjustment	adjusted studies	-	no adjustment or not specified
Funding		no direct relation with pesticides industry	-	relationship with industries or funding not specified

WHO: world health organization; FAB: French-American-British; ICD: international classification of diseases; AML: acute myeloid leukemia

Table S2. Details on exposure assessment in included studies.

First author and reference	Keywords used for the report or assessment of OPE	Additional tool to evaluate the probability of exposure	Source of exposure definition	Metrics of exposure measurement	Lookback time prior to diagnosis	Participation fractions for cases	Participation fractions for controls
Flodin, U. ³³	Pesticides (not otherwise specified)	NS	Mailed questionnaire	NS	NS	100%	90.8%
Richardson, S. ³⁴	Pesticides, insecticides, weed killers	Expert review	Detailed questionnaire following a standardized interview and assessed by a professional	high (>50% of the working time), medium (5-50%) exposure and low (<5%)	NS	72%	95%
Crane, M.M. ³⁵	Pesticides (not otherwise specified)	Expert review	Interview by one of the first two authors using a questionnaire	NS	NS	98%	100%
Ciccone, G. ³⁶	Pesticides (not otherwise specified)	4 levels probability by expert review	Questionnaire collected broad range of possible risk factors in addition to solvent exposure. The descriptions of the participants' tasks were then categorized in terms of their potential exposure	1) not exposed; 2) exposed to some of the agents listed, but not to the one under investigation; 3) "possibly" exposed (low probability of exposure) ; 4) "probably" exposed	NS	91%	99% hospital 82% population
Mele, A. ³⁷	Pesticides, herbicides	NS	Interviews following a questionnaire pilot-tested in a small sample	Several occupations described: agricultural workers, professional use of herbicides, professional use of pesticides, greenhouse workers	NS	99.6%	100%
Albin, M. ³⁸	Pesticides (not otherwise specified)	Expert review	Telephone interviews obtained by a professional	NS	NS	90%	72%

Lazarov, D. ³⁹	Pesticides (not otherwise specified)	3 levels probability by expert review	Questionnaire collecting occupational history, coded blindly according the Classification of the Italian Institute of Statistic and interpreted by a professional	1) not exposed; 2) 50-74% chance that exposure occurred; 3) >75%	<10 years (25 cases/ controls 11-20 (10/22) 21-30 (7/27) >31 (27/37)	89%	100%
Adegoke, O.J. ⁴⁰	Pesticides (not otherwise specified)	JEM: Mustafa Dosemeci's NCI for Shanghai	Interviews by trained interviewers using standardized Chinese questionnaires; self-reported information combined with job-exposure matrix assessment. Based on jobs held 3 years or more.	Duration of exposure: never, ever, < 10 years, ≥ 10 years + JEM (probability of exposure none, low, medium, high)	NS	91.4%	94%
Terry, P.D. ⁴¹	Pesticides, insecticides and/or rodenticides	NS	Self- and proxy-interviews allowing classification of individuals as having been employed or not in an occupational category potentially associated with leukemia risk	Duration of employment at occupation: ever, never, ≥ 1 year, and duration of participation in hobby: never, ever, up to five years, 5+ years	NS	84%	66%
Kaufman, D.W. ⁴²	Gramoxone, huama herbicide; carbaryl; methyl parathion, glyphosate; trichlorofon, methylamidophos, paris green, dimethoate, dichlorvos/propoxur/cyfluthrin, DDT, spark, unspecified pesticide, unspecified herbicide, unspecified rodenticide	NS	Interview conducted by trained professional	Details were described (1) median of duration of use (2) median lifetime pesticide days (3) non occupational pesticide (4) pesticide used near home	NS	100%	100%

Wong, O. ⁴³	Pesticides, herbicides and fertilizers	Committee of local experts	Interview by trained professional	Dichotomous classification of "ever/never"	NS	97%	100%
Strom, S.S. ⁴⁴	Pesticides, herbicides and fertilizers	JEM: NCI	Interview and proxy-interview	The Job-Exposure Matrix was used to determine an intensity level of exposure: none, low, moderate, and high.	NS	87%	77%
Parodi, S. ⁴⁵	Pesticides (not otherwise specified)	NS	Interview through a standardized questionnaire by trained interviewers to obtain detailed information	Exposed, not exposed	NS	88%	81%
Poynter, J.N. ⁴⁶	List of specific insecticides, herbicides, fungicides and fumigants.	NS	A self-administered questionnaire	Duration of exposure 1) <1-10 years 2) >10 years	NS	58%	64%

JEM: job-exposure matrix; OPE: occupational pesticides exposure; NCI: National Cancer Institute (Dosemeci *et al. Epidemiology*. **5**, 124-127 (1994)); ALOHA: job-exposure matrix for chronic obstructive pulmonary diseases (Sunyer, *et al. Am J Respir Crit Care Med*. **157**, 512-517 (1998)); NS: not specified.

Table S3. Details on acute myeloid leukemia (AML) patients and control sources.

First author	AML source		Controls source	
Flodin, U. ³³	Multicentric	Patients from the hospitals of Linköping, Norrköping, Örebro and Umeå and the cytological department of the hospital of Jönköping in Sweden	Population	Two series of referents were used (1) controls were identified through a general population register matched for gender, age and dwellings (2) randomly from the same general population register of the catchment areas of the hospital, ages and the number of individuals totaled
Richardson, S. ³⁴	Multicentric	Patients from the clinical department of hematology at Hotel-Dieu, Paris, or in the department of hematology of Hospital Henri-Mondor in Créteil, near Paris.	Hospital	Controls were identified among hospitalized patients in other departments of the same hospitals
Crane, M.M. ³⁵	Multicentric	Patients from Texas Medical Centers: Methodist, St. Luke's, Ben Taub, M.D. Anderson Cancer Center	Hospital	Located from admission printouts of participating hospitals
Ciccone, G. ³⁶	Monocentric	Patients from main hospital of Torino	Hospital and population	Two groups of controls were recruited (1) at hospital with no hematological or cancer diseases (including diseases of the digestive system, endocrine conditions and hypertension and CHD) (2) a random sample of the population living in the city of Torino
Mele, A. ³⁷	Multicentric	Patients from hospitals in Rome, Bologna and Pavia	Hospital	Controls were identified among out-patients seen in the same hematology departments, without a hematologic disorder, and among those with no cancer disorders seen in the same hospitals
Albin, M. ³⁸	Multicentric	Patients from Lund and Helsingborg	Population	Statistics Sweden selected 3 referents for each case. One referent in each matched set was randomly selected to be interviewed. When referents or their next-of kin could not be interviewed, other referents from the matched set were selected
Lazarov, D. ³⁹	Multicentric	Patients from two north west London Hospitals and the Haematology Department in Novi Sad, Yugoslavia	Hospital	Controls were identified among in-patients in the hospital from which the cases were recruited
Adegoke, O.J. ⁴⁰	Multicentric	Shanghai Cancer Registry which is composed of residents of urban Shanghai diagnosed with leukemia	Population	Controls were randomly identified from the general urban Shanghai population
Terry, P.D. ⁴¹	Multicentric	Cancer and Leukemia Group B (CALGB), a multi-institutional cooperative cancer treatment group in the USA	Population	Controls were identified through a two-stage random digit dialing procedure

Kaufman, D.W. ⁴²	Monocentric	Patients from Siriraj Hospital (Bangkok)	Hospital	Controls were identified at Siriraj Hospital with diagnoses considered generally unrelated to the exposures of interest
Wong, O. ⁴³	Multicentric	Patients from 29 participating hospitals in Shanghai	Hospital	Controls were randomly identified from patients admitted to the same hospital
Strom, S.S. ⁴⁴	Monocentric	Patients from University of Texas M. D. Anderson Cancer Center	Population	Control were randomly identified without previous history of cancer in Texas population
Parodi, S. ⁴⁵	Multicentric	Patients from 11 areas in Italy: namely, provinces of Varese, Forlì, Siena, Latina, Ragusa, Imperia, Florence, Novara, Vercelli, and Verona plus the town of Turin	Population	Controls were identified by random sampling of the resident population
Poynter, J.N. ⁴⁶	Multicentric	Patients from Minnesota Cancer Surveillance System	Population	Controls were identified through the Minnesota State driver's license/identification card list

Table S4. Detailed Newcastle-Ottawa scale evaluation for studies included in the meta-analysis.

First author and reference	Selection of cases and controls				Comparability	Exposure assessment			Total
	Cases definition	Cases representativeness	Control selection	Control definition	Matched for age and gender	Ascertainment of exposure	Same method for cases and controls	Non-response rate	
Flodin, U. ³³	0	0	1	0	2	0	1	0	4
Richardson, S. ³⁴	1	1	0	1	2	1	1	1	8
Crane, M.M. ³⁵	1	1	0	1	2	0	1	1	7
Ciccone, G. ³⁶	1	1	0	0	2	0	1	1	6
Mele, A. ³⁷	1	1	0	1	0	0	1	0	4
Albin, M. ³⁸	1	1	1	0	2	0	1	0	6
Lazarov, D. ³⁹	1	1	0	1	2	0	1	1	6
Adegoke, O.J. ⁴⁰	0	1	1	0	2	1	1	0	6
Terry, P.D. ⁴¹	1	1	1	0	2	0	1	0	6
Kaufman, D.W. ⁴²	1	1	0	1	2	0	1	1	7
Wong, O. ⁴³	1	1	0	1	2	1	1	1	8
Strom, S.S. ⁴⁴	1	1	1	1	2	0	1	1	8
Parodi, S. ⁴⁵	1	1	1	0	2	0	1	1	7
Poynter, J.N. ⁴⁶	1	1	1	1	1	0	1	0	6

Table S5. Reported funding of included studies.

First author and reference	Funding
Flodin, U. ³³	Swedish Work Environment Funding
Richardson, S. ³⁴	Inserm – Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
Crane, M.M. ³⁵	NIH K07
Ciccone, G. ³⁶	EEC-Europe Against Cancer Programme, Associazione Italiana per le Ricerche sul Cancro
Mele, A. ³⁷	Italian Ministry of Health, grant 500.4/RSC/70.18/T/1886, and by the Consiglio Nazionale della Ricerche Bilateral Project Italia-USA, grants 87.00186.04, 88.00600.04, and 89.02995.04.
Albin, M. ³⁸	Swedish Council for Work Life Research, Swedish Cancer Society, Medical Faculty of Lund University, Lund University Hospital, Gunnar, Arvid and Elisabeth Nilssons Research Foundation, and PREEM Research Foundation.
Lazarov, D. ³⁹	NR
Adegoke, O.J. ⁴⁰	Young Scientist Foundation, Chinese Ministry of Public Health; Grant (1U54-CA9140801) from the National Cancer Institute and National Institutes of Health.
Terry, P.D. ⁴¹	NR
Kaufman, D.W. ⁴²	Thailand Research Fund, Commission on Higher Education.
Wong, O. ⁴³	Benzene Health Effect Consortium, American Petroleum Institute
Strom, S.S. ⁴⁴	NCI, National Institute of Environmental Health Sciences
Parodi, S. ⁴⁵	NCI grant, Europe Against Cancer Programme, Lega Italiana per la Lotta contro I Tumori
Poynter, J.N. ⁴⁶	NCI R01

NR: not reported

Table S6. Variables included in the final model from the seven studies reporting adjusted odds ratios.

First author and reference	Age*	Gender*	Prior radiation or chemotherapy exposure*	Benzene and other solvent exposure*	Ethnicity	Geographical zones	Smoking	Education	Income	Other
Richardson, S. ³⁴	X	X	X		X	X ^a				
Ciccone, G. ³⁶	X					X ^{a,b}	X			
Mele, A. ³⁷	X	X				X ^a		X		occupations
Adegoke, O.J. ⁴⁰	X	X							X	
Terry, P.D. ⁴¹	X	X			X	X ^c	X	X		proxy respondent
Kaufman, D.W. ⁴²	X	X		X		X ^{a, d}			X	use of cellphones, occupational and non-occupational pesticide exposure, working with powerlines
Poynter, J.N. ⁴⁶	X	X	X			X ^{a, f}	X		X	

* refer to well-known risk factors of acute myeloid leukemia (Deschler, B. and Lübbert, M. *Cancer*, **107**, 2099-2107 (2006))

^a of residency, ^b of birth, ^c not detailed, ^d living near powerlines, pesticides used near the home, ^f living near a farm

Table S7. Sensitivity analysis including results from the study of Bassig *et al.*

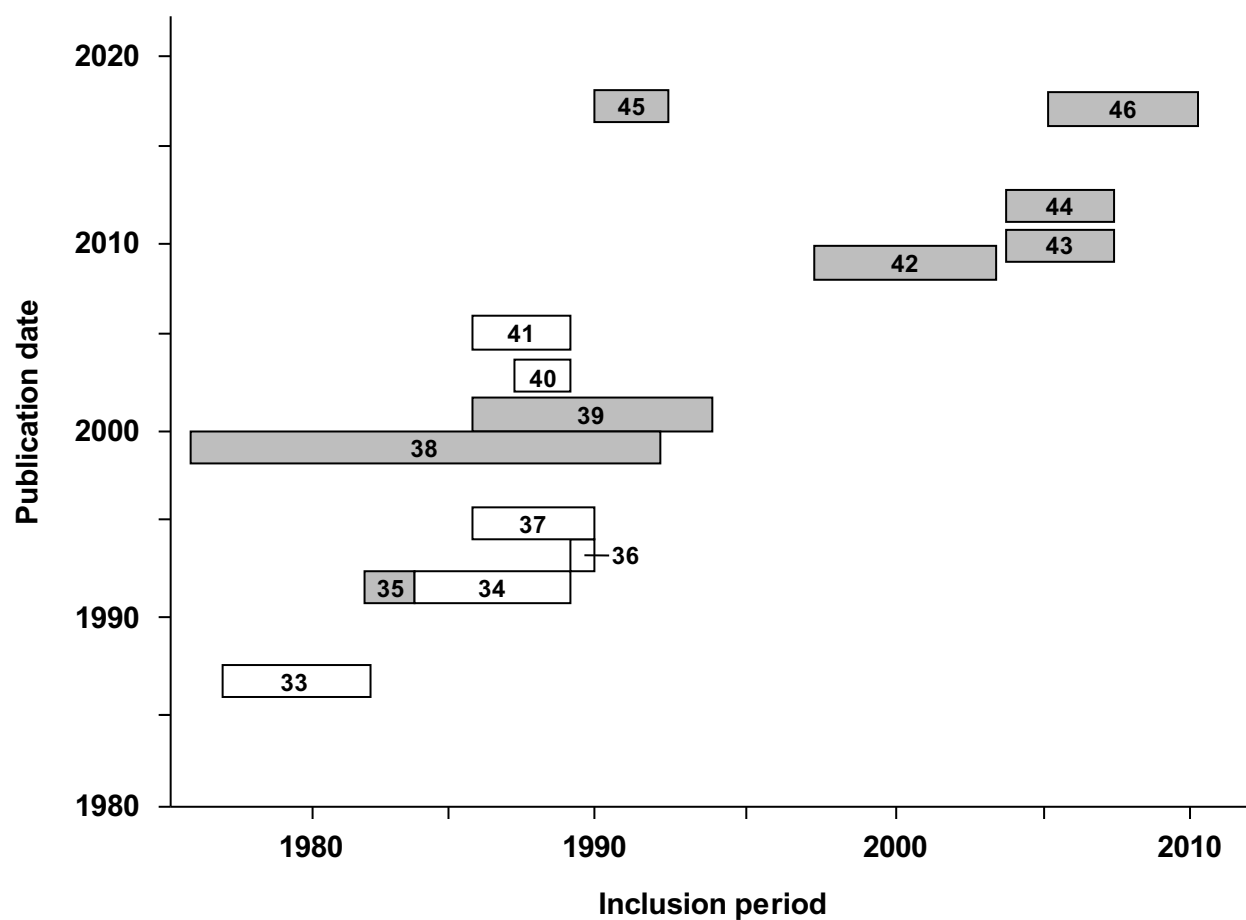
Pesticide/metabolite		Meta-analysis OR	Lower 95%CI	Upper 95%CI	p-value
Tertile 2 versus tertile 1	Oxychlordane	1.51	1.10	2.07	0.01
	trans-Nonachlor	1.51	1.10	2.07	0.01
	Heptachlor epoxide	1.50	1.09	2.06	0.01
	p,p'-DDT	1.51	1.10	2.07	0.01
	p,p'-DDE	1.49	1.09	2.05	0.01
	o,p'-DDT	1.47	1.08	2.01	0.01
	Mirex	1.51	1.10	2.08	0.01
	Hexachlorobenzene	1.44	1.05	1.97	0.02
	Dieldrin	1.51	1.10	2.07	0.01
	g-Hexachlorocyclohexane	1.50	1.09	2.06	0.01
	b-Hexachlorocyclohexane	1.48	1.08	2.03	0.01
Tertile 3 versus tertile 1	Oxychlordane	1.51	1.10	2.08	0.01
	trans-Nonachlor	1.51	1.10	2.07	0.01
	Heptachlor epoxide	1.51	1.10	2.08	0.01
	p,p'-DDT	1.51	1.10	2.08	0.01
	p,p'-DDE	1.51	1.10	2.07	0.01
	o,p'-DDT	1.50	1.09	2.06	0.01
	Mirex	1.50	1.09	2.06	0.01
	Hexachlorobenzene	1.49	1.09	2.05	0.01
	Dieldrin	1.51	1.10	2.08	0.01
	g-Hexachlorocyclohexane	1.47	1.07	2.02	0.01
	b-Hexachlorocyclohexane	1.50	1.09	2.06	0.01

Table S8. Stratified pooled odds ratio of the relationship between pesticide exposure and risk of acute myeloid leukemia.

Analyzed strata		No. studies	No. AML	No. controls	Reference number	Pooled OR [95%CI]	Heterogeneity tests: Q-test p-value (<i>I</i> ²) [†]	Publication bias Egger's test p-value
Studies design	AML population							
	Multicentric	11	3,18	8,31	32, 33, 34, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 45	1.16 [0.93-1.44]	0.10 (38%)	0.55
	Monocentric	3	775	1,638	36, 42, 44	4.25 [2.97-6.09]	0.47 (0%)	0.84
	Control population^a							
	Population-based	7	2,532	5,572	37, 38, 39, 40, 41, 43, 45	1.34 [0.76-2.34]	<0.001 (85%)	0.82
	Hospital-based	6	1,373	4,130	32, 33, 34, 35, 42, 44	1.55 [1.17-1.98]	0.29 (20%)	0.62
	Study quality							
	NOS≤6	7	1,973	4,569	36, 37, 40, 41, 43, 44, 45	1.20 [0.82-1.74]	0.04 (51%)	0.25
	NOS>6	7	1,982	5,379	32, 33, 34, 35, 38, 39, 42	1.80 [0.17-2.78]	<0.001 (80%)	0.75
	Risk of bias^b							
Pesticide exposure recording methods	Unclear or high	4	1,713	4,749	35, 36, 39, 41, 42, 43, 44, 45	1.24 [0.85-1.82]	0.08 (45%)	0.51
	Low	6	2,242	5,199	32, 33, 34, 37, 38, 40	1.79 [1.07-2.97]	<0.001 (86%)	0.86
	Exposure assessment							
	Other	2	464	1,702	40, 45	0.92 [0.67-1.26]	0.56 (0%)	NA
	PTP	12	3,491	8,246	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44	1.64 [1.15-2.33]	<0.001 (75%)	0.76
Cofounding factors analysis	Job exposure matrix or expert review							
	No	6	1,625	6,000	32, 39, 40, 43, 44, 45	1.12 [0.84-1.51]	0.16 (37%)	0.15
	Yes	8	2,330	3,948	33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42	1.82 [1.12-2.95]	<0.001 (76%)	0.55
	Adjusted OR							
	Yes	7	2,172	4,815	33, 35, 38, 39, 41, 42, 45	1.51 [0.95-2.40]	< 0.001 (81%)	0.54
Studied populations	No	7	1,783	5,133	32, 34, 36, 37, 40, 43, 44	1.52 [0.93-2.48]	0.004 (67%)	0.32
	Geographical zone							
	Europe	7	1,208	4,595	34, 36, 39, 41, 42, 44, 45	1.25 [0.87-1.82]	0.04 (53%)	0.26
	North America	4	1,702	2,651	35, 38, 40, 43	1.72 [0.55-5.43]	<0.001 (91%)	0.75
	Asia	3	1,045	2,702	32, 33, 37	1.74 [1.32-2.30]	0.33 (9%)	0.81
	Inclusion periods							
	Before 1995	10	2,103	5,764	34, 35, 36, 39, 37, 41, 42, 43, 44, 45	1.23 [0.91-1.66]	0.16 (31%)	0.53
	After 1995	4	1,852	4,184	32, 33, 38, 40	2.03 [1.07-3.85]	<0.001 (92%)	0.41
	AML							
	Other ^c	9	2,483	7,507	33, 34, 35, 37, 39, 40, 41, 44, 45	1.13 [0.89-1.45]	0.05 (50%)	0.46
Pesticide subtypes ^d	<i>De novo</i>	5	1,472	2,441	32, 36, 38, 42, 43	2.81 [1.58-5.00]	0.03 (62%)	0.18
	Herbicides	4	1,379	3,953	33, 40, 44	1.18 [0.89-1.57]	0.25 (26%)	0.41
	Insecticides	3	876	1,957	33, 34	1.47 [1.15-1.88]	0.92 (0%)	NA
	Fumigants	2	1,127	2,792	33, 40	1.52 [0.86-2.67]	0.82 (0%)	NA
All studies		14	3,955	9,948	All included [33-46]	1.51 [1.10-2.08]	<0.001 (76%)	0.82

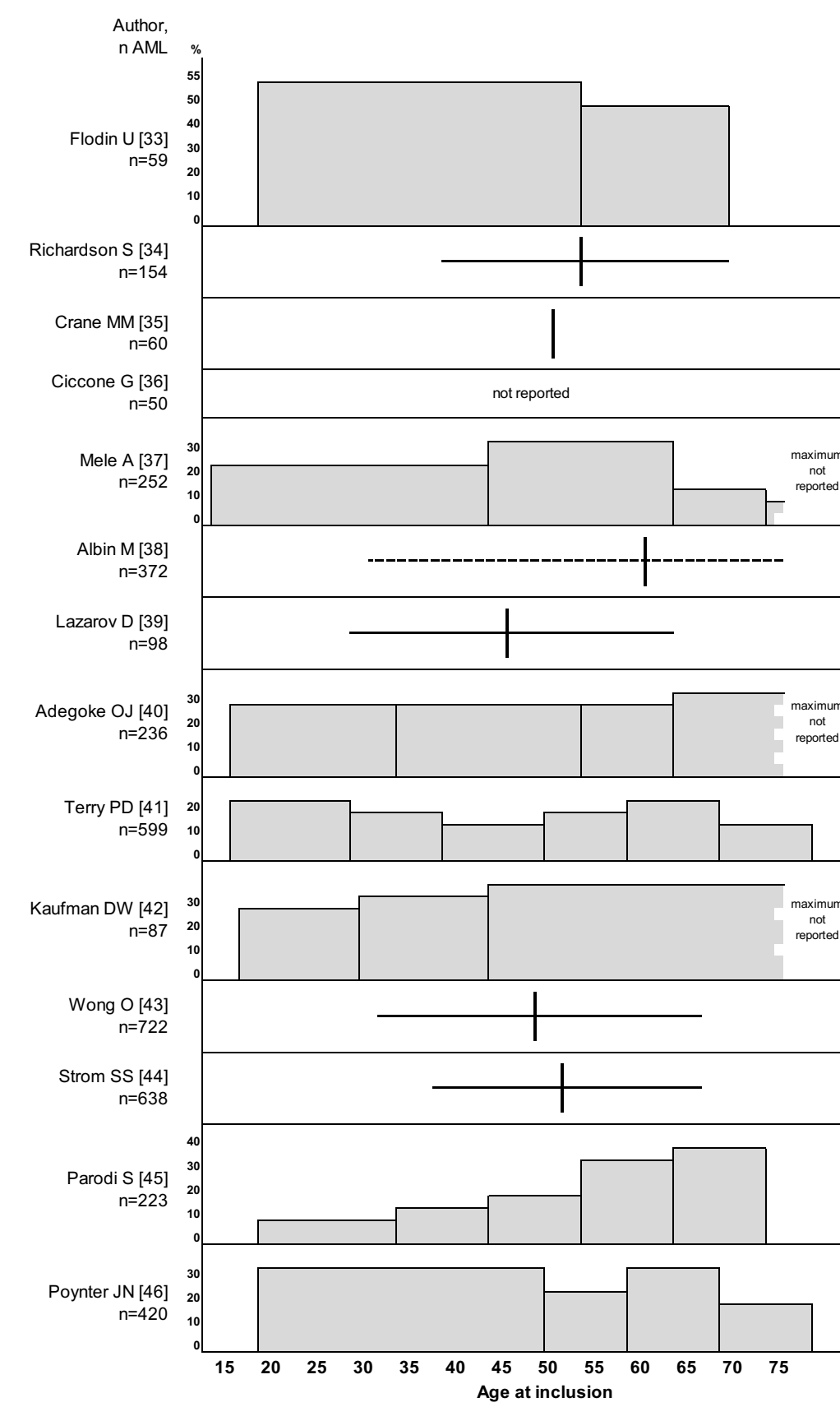
Subgroups are in ascending order ordered according to their mean effects. ^a Cicconne *et al.*⁴² not included: hospital- and population-based; ^b risk of bias classification was performed using correspondence analysis described in Fig S3 ^c Other: de novo status was not mentioned or 0.69% of secondary AML in Wong *et al.*¹⁹; ^d Only studies reporting specific pesticide exposure were included for this subset analysis. NOS: Newcastle-Ottawa scale; PTP: peer-to-peer interviews.

Fig S1. Inclusion periods and date of publication of studies included in the meta-analysis.



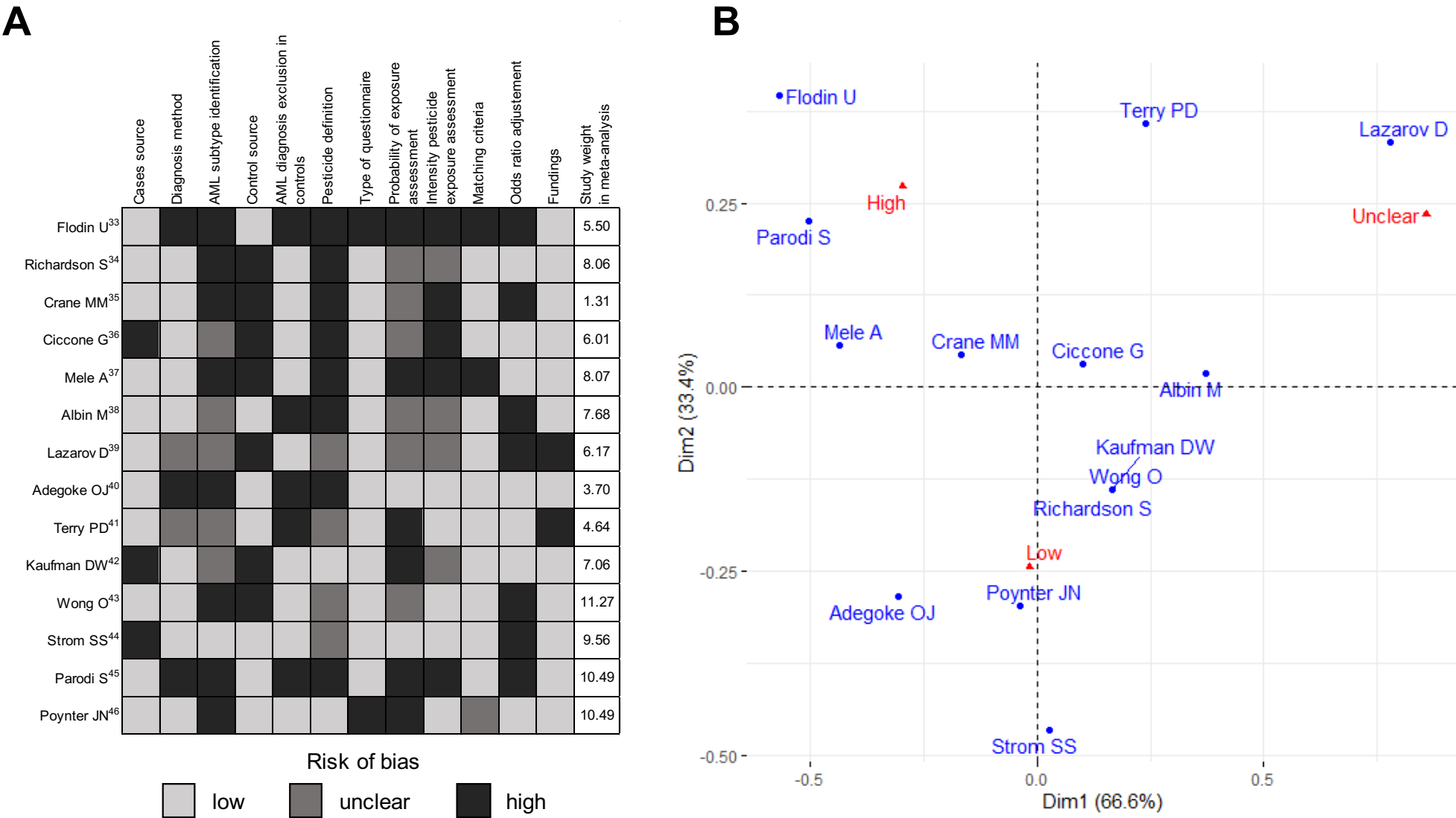
Studies are identified by their position in the reference list. White rectangles represent references included in the previous meta-analysis published in 2007¹⁸.

Fig S2. Graphical representation of inclusion age heterogeneity between included studies.



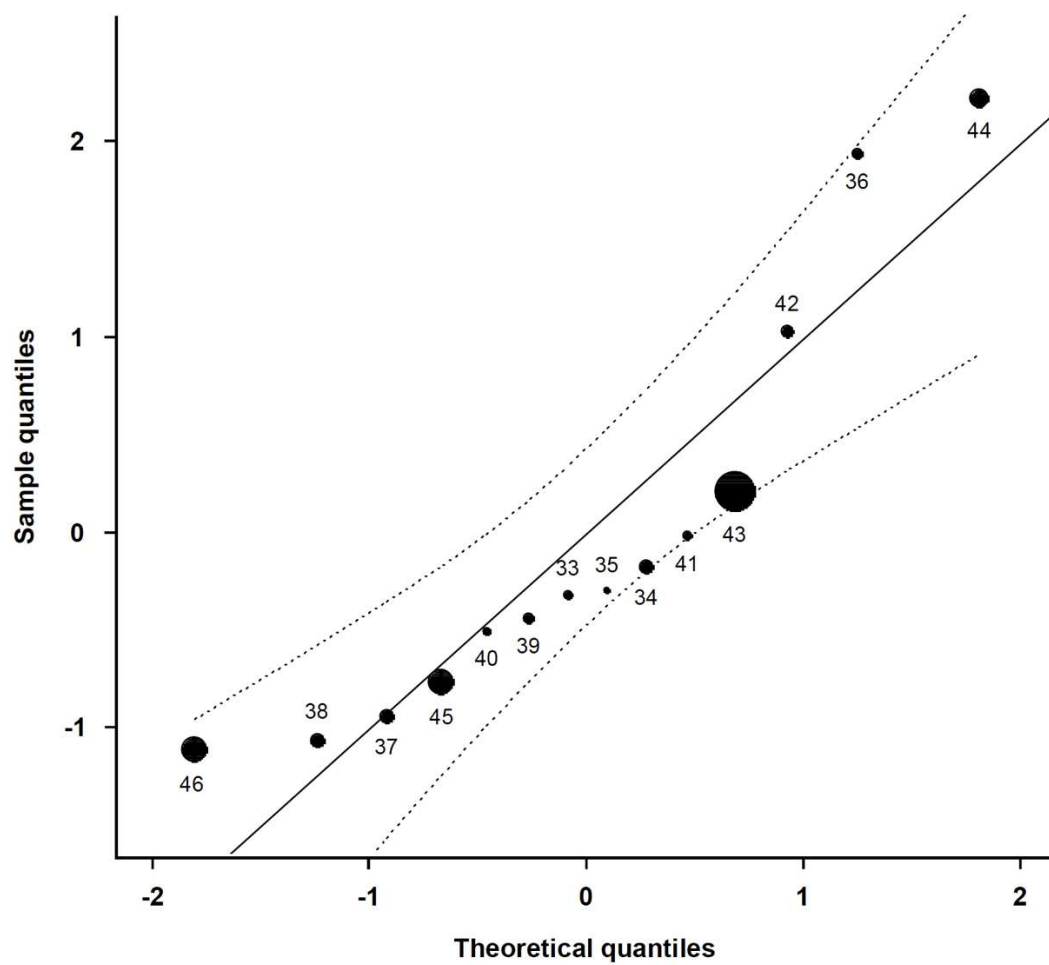
Bar plots represent the proportions of patients included. Vertical lines represent the mean and horizontal lines the standard deviation except for Albin 2000 where vertical and horizontal lines represent the median and 10-90% deciles.

Fig S3. Bias assessment within each study.



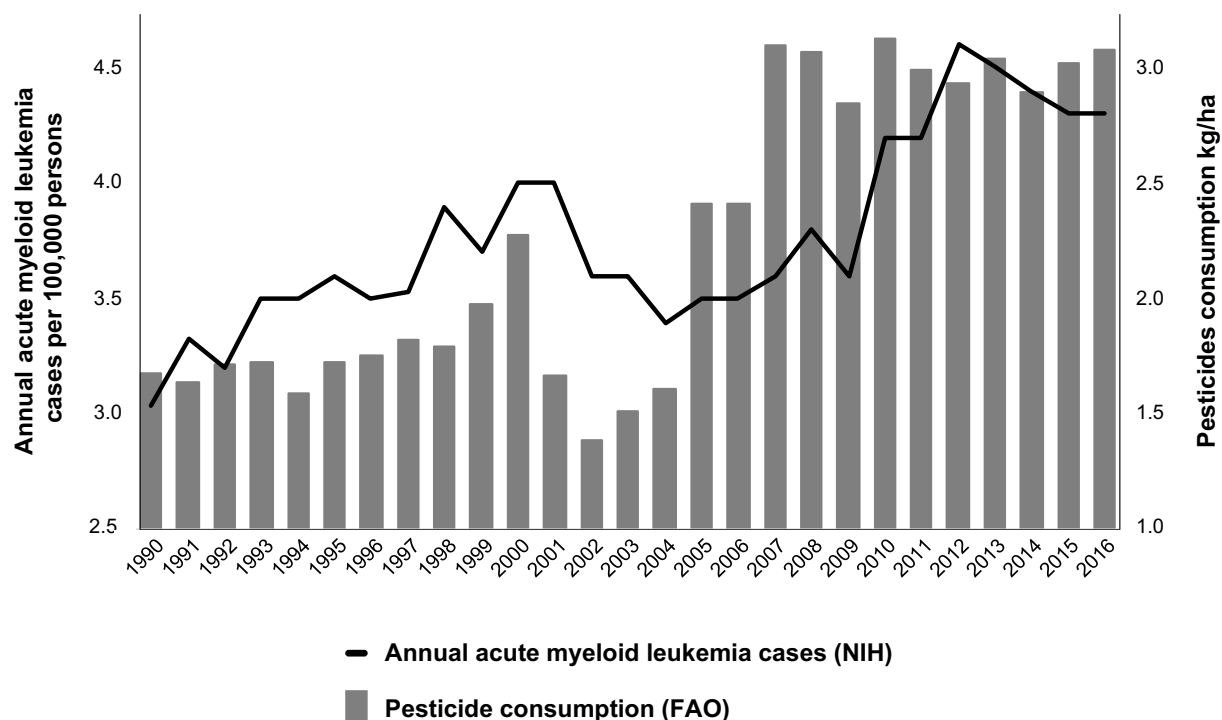
(A) Each study was assessed with three levels of risk of bias (low, unclear and high, Table S1). The weight of studies in the overall meta-analysis is represented. (B) Using the distribution of low, unclear and high risk (red) among each study included (blue), a correspondence analysis was performed to identify groups of studies according to the risk of bias.

Fig S4. Outlier studies identification with Q-Q plot.



Studies are identified by their position in the reference list. The plot size is proportional to the weight of each study is the pooled odds ratios.

Fig S5. Frequency of acute myeloid leukemia over time together with pesticide usage in the USA.



Pesticide use in kg/ha in the USA since 1990 according to the Food and Agriculture Organization (FAO)
New cases of AML per 100,000 persons according to the national institute of health (NIH).

We compared available USA data from the FAO and National Institute of Health (NIH) on the annual incidence of AML and concomitant consumption of pesticides since 1990. This disclosed a weak positive correlation between these two variables through linear regression analysis ($R^2=0.42$).

NIH data available at:

https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/browse_csr.php?sectionSEL=13&pageSEL=sect_13_table.08

FAO data available at:

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>

2) Synthèse

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence un lien entre l'exposition professionnelle aux pesticides et le risque augmenté de LAM. Même si aucun lien de causalité ne peut être établi par ce type d'étude, il met en évidence la nécessité d'études *in vitro* pour poursuivre les investigations sur l'incrimination de ces produits phytosanitaires à doses professionnelles sur le risque de LAM. De façon intéressante, l'OR était plus important lors d'une exposition aux insecticides (OR = 1,45 ; IC 95 % : 1,16-1,81), les insecticides avaient déjà été incriminés dans la méta-analyse publiée en 2014 montrant un lien entre le risque de SMD et l'une exposition professionnelle aux pesticides (OR = 1,71 ; IC 95 % : 1,22-2,40)(114). Dans ces deux méta-analyses, l'étude de sous-groupe a également montré que l'OR était d'autant plus significatif en Asie, augmentant le risque de SMD (OR = 2,0 ; IC 95 % : 1,17-3,41) et de LAM (OR = 1,74 ; IC 95 % : 1,32-3,41) lors d'une exposition professionnelle aux pesticides.

L'étude de l'incidence des LAM en Asie, montre une tendance à la corrélation entre l'incidence des LAM depuis les années 2000 et la consommation de pesticides en Kg/Ha (Figure 13).

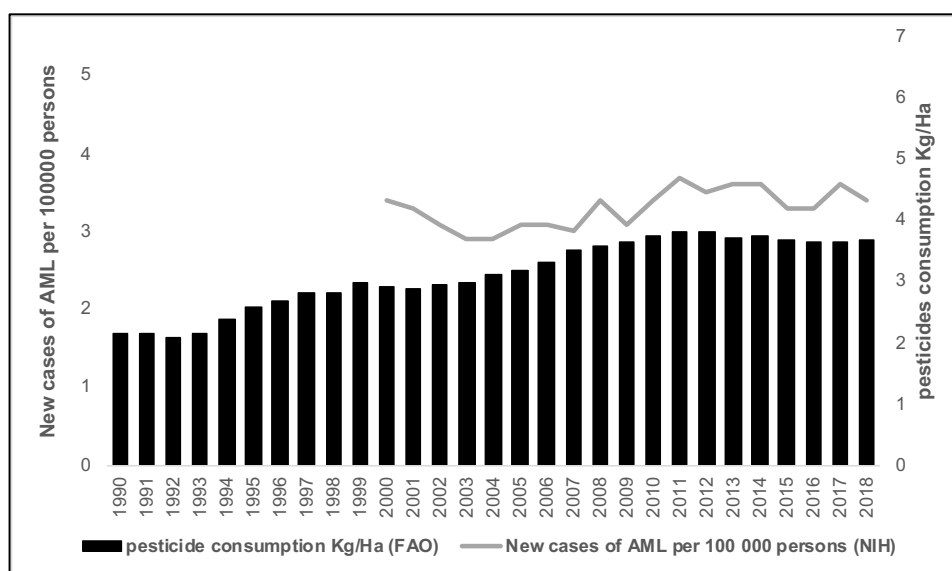


Figure 13 : Corrélation entre la consommation de pesticides et l'incidence des LAM en Asie
La consommation des pesticides est exprimée en Kg/Ha et l'incidence de LAM en Asie est donnée pour 100 000 habitants.

Dans 30% des cas, les SMD (état pré-leucémique) évoluent en LAM, l'exposition des pesticides à fortes doses semble donc être un facteur de risque de ces hémopathies.

II. Exposition du microenvironnement médullaire à un cocktail de pesticides à faibles doses et le risque de syndromes myélodysplasiques

1) Introduction

Bien que l'impact des expositions aux fortes doses de pesticides sur le risque d'hémopathies soit largement étudié, l'impact des expositions à de faibles doses de pesticides sur le microenvironnement médullaire est quant à lui méconnu, et pourrait également participer au développement d'hémopathies myéloïdes, notamment chez les sujets âgés. En effet, cette classe de la population a été exposée chroniquement à ces différents résidus de pesticides, tout au long de leur vie. Ainsi, cette exposition chronique et cumulative pourrait participer à la physiopathologie des syndromes myélodysplasiques.

Nous avons donc étudié les effets *in vitro* de faibles doses (hNDI, ADI, 3ADI) d'un mélange comprenant 7 pesticides (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, éthyle de chlorpyrifos, diazinon et diméthoate) fréquemment rencontrés dans l'alimentation, selon les rapports de l'EFSA(146–148) sur des cellules stromales mésenchymateuses médullaires (MO-CSM) primaires. Les MO-CSM de patients atteints de syndromes myélodysplasiques ont ainsi été comparés aux MO-CSM exposés aux pesticides. Les MO-CSM primaires ont été obtenues après culture de cellules de moelle osseuse totale prélevées sur des volontaires sains selon le protocole HEALTHOX (Clinicaltrials.gov # NCT02789839) ou sur des patients atteints de SMD selon le protocole MYLESYM (CPP Tours et AFSSAPS: 2011-A00262-39).

Après 21 jours d'exposition aux pesticides, nous avons observé une diminution importante de la prolifération cellulaire, une augmentation de la sénescence et des cassures doubles-brins de l'ADN (γ H2Ax par cytométrie et immunofluorescence). De même, l'expression du gène codant pour l'enzyme ALDH2 (qRT-PCR) était diminuée. Cette enzyme est connue pour détoxifier l'acétaldéhyde dans la cellule, une molécule classée comme cancérigène (groupe 1) pour l'homme par le CIRC. De plus, nous avons montré une diminution de son activité enzymatique (ELISA), associée à une augmentation de la concentration en acétaldéhyde. Ces mêmes anomalies ont été retrouvées dans les MO-CSM de patients atteints de SMD.

Ainsi, l'exposition chronique des MO-CSM primaires à de très faibles doses de pesticides modifie l'expression d'ALDH2 et son rôle protecteur dans la cellule. Cette modification

pourrait donc participer à la physiopathologie des SMD chez les personnes âgées. Cette étude fait l'objet d'une soumission au journal Cancers (Basel).

Article

Low-Dose Pesticides Alter Primary Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells through ALDH2 Inhibition

Amélie Foucault ^{1,2}, Noémie Ravalet ^{1,2} , Joevin Besombes ^{1,2}, Frédéric Picou ^{1,2} , Nathalie Gallay ^{1,2} , Laetitia Babin ², Jérôme Bourgeois ^{1,2}, Sophie Hamard ², Jorge Domenech ^{1,2}, Pascal Loyer ^{3,4,5} , Nicolas Vallet ⁶ , Julien Lejeune ^{2,6}, Emmanuel Gyan ^{2,6}, Marie C. Béné ^{7,8}, François Vallette ^{4,5,9}, Christophe Olivier ^{9,10} , and Olivier Hérault ^{1,2,4,5,8,11,*}

- ¹ Department of Biological Hematology, Tours University Hospital, 37000 Tours, France; amelie.foucault@univ-tours.fr (A.F.); noemie.ravalet@univ-tours.fr (N.R.); joevin.besombes@etu.univ-tours.fr (J.B.); f.picou@chu-tours.fr (F.P.); n.langonne@chu-tours.fr (N.G.); j.bourgeois@chu-tours.fr (J.B.); jorge.domenech@univ-tours.fr (J.D.)
- ² CNRS ERL 7001 LNOx, EA 7501, Tours University, 37000 Tours, France; laetitia.babin@univ-tours.fr (L.B.); sophie.hamard@univ-tours.fr (S.H.); julien.lejeune@univ-tours.fr (J.L.); emmanuel.gyan@univ-tours.fr (E.G.)
- ³ INSERM U1241, NuMeCan Institute, 35000 Rennes, France; pascal.loyer@univ-rennes1.fr
- ⁴ CNRS GDR 3697 Micronit “Microenvironment of Tumor Niches”, 37000 Tours, France; francois.vallette@inserm.fr
- ⁵ Cancéropole Grand Ouest (CGO), NET “Niches and Epigenetics of Tumors” Network, 44000 Nantes, France
- ⁶ Department of Hematology & Cell Therapy, Tours University Hospital, 37000 Tours, France; nicolas.vallet@inserm.fr
- ⁷ Department of Biological Hematology & CRCINA, Nantes University Hospital, 44000 Nantes, France; mariechristine.bene@chu-nantes.fr
- ⁸ Fédération Hospitalo-Universitaire, “Grand Ouest Against Leukemia” (FHU GOAL), 49000 Angers, France
- ⁹ INSERM UMR 1232 CRCINA, 44000 Nantes, France; christophe.olivier@univ-nantes.fr
- ¹⁰ Faculty of Pharmaceutical and Biological Sciences, Nantes University, 44000 Nantes, France
- ¹¹ OPALE Carnot Institute, The Organization for Partnerships in Leukemia, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France
- * Correspondence: olivier.herault@univ-tours.fr



Citation: Foucault, A.; Ravalet, N.; Besombes, J.; Picou, F.; Gallay, N.; Babin, L.; Bourgeois, J.; Hamard, S.; Domenech, J.; Loyer, P.; et al. Low-Dose Pesticides Alter Primary Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells through ALDH2 Inhibition. *Cancers* **2021**, *13*, 5699. <https://doi.org/10.3390/cancers13225699>

Academic Editors: Ada Funaro and Nicole M. Gatto

Received: 20 September 2021
Accepted: 9 November 2021
Published: 14 November 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Pesticide exposure is a public health concern. Two recent studies reported that exposure of normal primary bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (BM-MSCs) to low-dose pesticide mixture induces deleterious consequences, such as oxidative stress, senescence, accelerated aging and increased sensitivity to oncogenic hits. Here, we show that exposure to this mixture decreases aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) activity, with a concomitant increase in acetaldehyde level and DNA damage and alters the MSC capacity to support primitive hematopoiesis. Similar abnormalities were observed in bone marrow-MSCs from patients suffering from myelodysplastic syndrome (MDS), suggesting a role of pesticide-induced ALDH2 inhibition in the pathophysiology of this pre-leukemic disease.

Abstract: (1) Background: The impact of occupational exposure to high doses of pesticides on hematologic disorders is widely studied. Yet, lifelong exposure to low doses of pesticides, and more particularly their cocktail effect, although poorly known, could also participate to the development of such hematological diseases as myelodysplastic syndrome (MDS) in elderly patients. (2) Methods: In this study, a cocktail of seven pesticides frequently present in water and food (maneb, mancozeb, iprodione, imazalil, chlorpyrifos ethyl, diazinon and dimethoate), as determined by the European Food Safety Authority, were selected. Their in vitro effects at low-doses on primary BM-MSCs from healthy volunteers were examined. (3) Results: Exposure of normal BM-MSCs to pesticides for 21 days inhibited cell proliferation and promoted DNA damage and senescence. Concomitantly, these cells presented a decrease in aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2: mRNA, protein and enzymatic activity) and an increase in acetaldehyde levels. Pharmacological inhibition of ALDH2 with disulfiram recapitulated the alterations induced by exposure to low doses of pesticides. Moreover, BM-MSCs capacity to support primitive hematopoiesis was significantly altered. Similar biological abnormalities were found in primary BM-MSCs derived from MDS patients. (4) Conclusions: these

results suggest that ALDH2 could participate in the pathophysiology of MDS in elderly people long exposed to low doses of pesticides.

Keywords: hematopoiesis; pesticides; mesenchymal stem/stromal cells; ALDH2; myelodysplastic syndrome

1. Introduction

The increasing usage of pesticides worldwide [1], and its consequences on human health are an important public concern. Many research projects have been conducted to clarify the carcinogenic risk in case of occupational pesticide exposure (OPE). The association between OPE and hematological malignancies has been well established for lymphoid diseases several years ago [2]. A recent report of French Institute of Health and Medical Research (INSERM) reviewed the pesticides for which there is a strong presumption of a link between bone marrow disease (multiple myeloma) and exposure to high doses of pesticides [3]. Pesticides reported are dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT, organochlorine family), carbaryl (carbamate family), permethrin (pyrethroid family), glyphosate (aminophosphonate glycine) and captan (phthalimide family). These pesticides can affect the human bone marrow, but it is a non-exhaustive list since all medical studies concern exposure to high doses of pesticides.

This association between OPE and hematological malignancies was suspected for myelodysplastic syndrome (MDS), a preleukemic disease [4,5]. Moreover, our group has recently published a meta-analysis reporting an increased risk of acute myeloid leukemia (AML) occurrence after exposure to high-dose pesticides [6]. Little is known however regarding the potentially deleterious effects on hematopoiesis of long-term exposure to low-dose pesticides, and to date, no hematotoxicity was reported. This question is of interest since the general population is exposed daily to pesticide residues, especially due to the contamination of water, fruits and vegetables [7]. Specific institutions such as the European Food Safety Authority (EFSA) monitor pesticide residues found in food to determine the acceptable daily intake (ADI) of each of them. Unfortunately, these data do not consider the cocktail effect of pesticides mixtures, which could potentially increase the dangerousness of these xenobiotics [8]. According to a recent EFSA report, pesticide residues were found in 41% of analyzed food samples [8].

It may thus be hypothesized, in light of alterations reported for high-dose OPE, that hematopoiesis could also be altered by lifelong exposure to low doses of such cocktails, notably via the long-term impregnation of the microenvironment by low-dose pesticides, which could participate in the dysregulation of normal hematopoiesis and induce myeloid malignancies. This postulate is reinforced by recent publications of our research consortium, in which BM-MSCs exposed to a cocktail of low doses of the seven pesticides frequently identified in the last few years in food samples (maneb, mancozeb, iprodione, imazalil, chlorpyrifos ethyl, diazinon, dimethoate, classified by decreasing abundance in analyzed samples [8]) presented such functional alterations as a decrease in proliferation, an adipocytic differentiation bias, the induction of oxidative stress, the promotion of senescence and an increased sensitivity to oncogenic hits [9,10].

The bone marrow (BM) microenvironment and more particularly BM-MSCs play critical roles in sustaining normal hematopoiesis. Alterations of these cells are also involved in the pathophysiology of several types of malignant hematological disorders. In MDS and AML, a decrease in the proliferative capacity of BM-MSCs has been shown to be concomitant to normal hematopoiesis failure [11]. Moreover, BM-MSCs from AML patients have been reported to express early adipocyte differentiation markers and an aberrant DNA methylation profile [11–15]. Several studies further suggest that alterations of BM-MSCs can lead to the appearance of malignant clones in vivo [14–17]. Myeloproliferative disorders have been reported after loss of expression of the retinoic acid receptor- γ

(RAR γ) by BM-MSCs in an altered murine microenvironment [16]. MDS features have appeared in mice invalidated for *Dicer1* gene in the osteoblastic lineage (*Dicer1*^{lox/lox}-Osterix-Cre) [17]. AML have developed in mice following constitutive activation of the Wnt pathway, FoxO1/activated β -catenin interaction or a genetic alteration of the Notch pathway in the osteoblastic lineage [18,19].

Here, we examined the effect of the cocktail of seven pesticides mentioned above, at low-doses, on primary normal BM-MSCs and compared them to the features of BM-MSCs from MDS patients. We confirmed the appearance of a high level of reactive oxygen species (ROS), senescence and DNA damage. We then demonstrated that these alterations are related to an inhibition of ALDH2. Finally, we observed that the inability of primary MDS BM-MSC to sustain primitive hematopoiesis, which present similar alterations of the ALDH2 axis, was reproduced in normal BM-MSCs exposed to low-dose of pesticides.

2. Materials and Methods

2.1. Cells

Primary bone marrow MSCs (BM-MSCs) were isolated and characterized functionally as reported previously [20] from young healthy volunteers (HEALTHOX protocol; ClinicalTrials.gov # NCT02789839, University Hospital, Tours, France) and MDS patients (MDS-BM-MSCs) (MYLESYM protocol, CPP Tours and AFSSAPS: 2011-A00262-39) (Table S1). Normal CD34⁺ cells used for cobblestone area forming cell (CAFC) assays were obtained during peripheral collection after G-CSF stimulation. CD34⁺ cells were enriched using a magnetic bead separation kit (Mini-MACS[®], Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany), as described [21] and the purity of selected cells was >85%. Cell viability in all experiments was quantified by trypan blue exclusion.

2.2. Cell Culture and Pesticide Treatment

Three doses of pesticides were used. The first was the high nutritional daily intake (hNDI), calculated for the French population of all ages and corresponding to the lowest doses of pesticides used in our study. The second was the ADI, which is the threshold of safety in humans for lifetime exposure. The last was a value of three times the ADI (3ADI).

BM-MSCs were amplified as previously described [20]. Briefly, they were cultured in 150 cm² flasks (Corning[®] cell culture flask, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 3 weeks (37 °C, 5% CO₂) in α -MEM supplemented with FGF2 (1 ng/mL, R&D system, Minneapolis, MN, USA) and were tested at passages 2 to 4 (2000–4000 cells/cm²). This medium, supplemented with pesticides (hNDI, ADI and 3ADI), was renewed every 3 days. The doses of pesticides used (chlorpyrifos ethyl, dimethoate, diazinon, iprodione, imazalil, maneb and mancozeb; Sigma-Aldrich) were extrapolated, for each pesticide, from 3 values according to previous studies (Table S2) [9,10].

2.3. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

After 21 days of pesticide exposure, BM-MSCs mRNA was extracted and ALDH2 transcripts were quantified by RT-qPCR as previously described [22]. The geometric Ct means of human *ACTB*, *B2M* and *GAPDH* genes were used to normalize the expression of ALDH2 transcripts [23]. ALDH2—F: cctctatgtggccaacctg, R: ccaatccaggcacaatgtt and probe: cagcctcc; *ACTB*—F: attggcaatgagcgggtc, R: cgtggatgccacaggact and probe: gctggaag; *B2M*—F: ttctggcctgcaggctatc, R: tcagcaaatgtgactttacattc and probe: ccagccgc; *GAPDH*—F: agccacatcgctcagacac, R: gcccaatcgaccaaattcc and probe: ccagccgc.

2.4. ALDH Family Expression Array

cDNAs were synthesized using the RT2 First Strand Kit (Qiagen, Hilden, Germany) from 500 ng total RNA, and qPCR reactions were performed using the Custom RT2 PCR Array Kit (Qiagen), following the supplier's guidelines.

2.5. Protein Extraction and Western Blot Analyse

After 21 days of pesticide exposure, BM-MSCs were lysed in NP40 cell lysis buffer (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing protease and phosphatase inhibitors. Western blot analyses were performed using rabbit polyclonal antibodies against human ALDH2 diluted at 1/1000 (Proteintech, Rosemount, IL, USA) and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at 1/10,000. Detection was performed with ChemiDoc™ Gel Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA, USA).

2.6. ALDH2 Activity, Acetate and Acetaldehyde Levels

ALDH2 activity was measured using the mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity assay kit (Abcam, Cambridge, UK). Acetate concentration was determined with the acetate assay kit (Abcam) following the supplier's guidelines. Acetaldehyde concentration was quantified as following: (i) sonication of 10^7 cells in PBS; (ii) centrifugation at $10,000 \times g$, 20 min, 4 °C and collection of supernatants; (iii) quantification of acetaldehyde concentration with the acetaldehyde assay kit (Megazyme, Bray, Ireland) following the supplier's guidelines. Optical density was measured with CLARIOstar® monochromator microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

2.7. Senescence Analysis

Senescent cells were quantified by using a histochemical staining kit (SA-beta-Galactosidase, Sigma-Aldrich) following the supplier's guidelines. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized (PBS/Triton X-100 0.1%, 10 min, room temperature), blocked with gelatin from cold water fisher skin 5% (Sigma-Aldrich) Triton X-100 0.1% (Sigma-Aldrich) in PBS and were incubated overnight at 4 °C with anti-GLB1/β galactosidase polyclonal rabbit antibody (Abcam) at 1/500, followed by secondary anti-rabbit labeled with FITC (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK) at 1/2000 at room temperature for 2 h.

2.8. Comet Assay

DNA fragmentation was measured by alkaline comet assay after pesticides exposure. Briefly, 70,000 cells were seeded on low melting point agarose (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA). CometSlide (Trevigen) was filled with 70 µL of the cell/agarose suspension and was placed at 4 °C for 5 min. The cells were then lysed and left at 4 °C for 30 min, transferred to freshly prepared cold electrophoresis buffer (200 mM NaOH, 1 mM EDTA) and incubated at room temperature in the dark for 40 min. Then, electrophoresis was performed in the CometAssay® Electrophoresis System (Trevigen) at 21 V for 30 min. Slides were washed and fixed (5 min in 70% EtOH), dried and stained 5 min at 4 °C with SYBR Green I (Trevigen) or DAPI (Invitrogen) diluted 1/10,000. Fluorescence images were acquired with a Ti Series Nikon eclipse (Nikon, Tokyo, Japan) and analyzed using ImageJ software version 1.53 (Wayne Rasband, NIH, MA, USA).

2.9. Phospho-S139 γH2AX Quantification by Flow Cytometry

Phospho-S139 γH2AX quantification was performed by flow cytometry as previously described [24] using FITC-conjugated anti-phospho-S139 γH2AX antibody (Millipore, Burlington, MA). Analyses were performed with BD Accuri C6® (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analyzed using FlowJo® v10.1 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

2.10. Foci Analyses by Immunofluorescence

After 21 days, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized (PBS/Triton X-100 0.1%, 10 min, room temperature), blocked with gelatin from cold water fish skin 5%, Triton X-100 0.1% (Sigma-Aldrich) in PBS, and were incubated overnight at 4 °C with anti-phospho-S139 γH2AX monoclonal mouse antibody (Abcam) at 1/1000, anti-MDC1 polyclonal rabbit antibody (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA) at 1/500 and anti-

53BP1 polyclonal goat antibody (R&D systems) at 1/1000, followed by a secondary anti-mouse antibody labeled with TRITC (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK), Alexa Fluor® 647 conjugated anti-goat (Jackson ImmunoResearch) and FITC-conjugated anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch) at 1/2000 each at room temperature for 2 h. Fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Germany) confocal microscope and analyzed using ImageJ software.

2.11. Limiting Dilution CAFC Assay

BM-MSCs were exposed to pesticides only during the 21 days of expansion culture before co-cultures with normal CD34⁺ cells, and CAFC assays were performed as previously described and as detailed in supplementary methods [22]. Briefly, CD34⁺ cells were thus co-cultured with the pesticide-exposed BM-MSCs for 7 days (37 °C, 5% CO₂), seeded at 6000 CD34⁺/cm² (ratio CD34⁺ cells/BM-MSCs = 1/3) in Myelocult™ H5100 medium (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). At the end of coculture, CD34⁺ cells were sorted (BD FACSMelody™ cell sorter, Becton-Dickinson) and cultured on MS5 stromal cells [25] for 5 additional weeks in 96-well plates (37 °C, 5% CO₂) at 6 different dilutions (range 1–100 CD34⁺ cells/well) in 0.2 mL of Myelocult™ H5100 medium. After 5 weeks of co-culture, each well was examined by inverted phase contrast microscopy (DMI 3000 B, Leica) to identify cobblestone areas. The percentage of wells with at least one CAFC was quantified and the frequency of CAFC in the initial CD34⁺ cell population was calculated as previously described [26]. The CAFC proliferative capacity was determined by subculturing the wells containing one cobblestone area in semi-solid medium (MethoCult™ H4434, StemCell Technologies) to determine the mean total number of clonogenic progenitors (including CFU-GM, BFU-E and CFU-M) generated by each CAFC.

2.12. ALDH2 Inactivation

Crispr/Cas9 knockdown of *ALDH2* gene expression was performed with guide RNA (gRNA) targeting the *ALDH2* gene (or scramble gRNA). Crispr/Cas9 knockdown of *ALDH2* gene expression was designed using CRISPOR software version 4.97 [27] or based on previously published data [28]. Human primary BM-MSCs were transfected using TransIT-CRISPR® Transfection Reagent (Sigma-Aldrich). *ALDH2* mRNA and protein levels were quantified as described above.

ALDH2 inhibition in BM-MSCs by disulfiram [29] was performed by exposure of BM-MSCs (cultured in 75 cm² flasks as previously described) for two weeks to 0.05 µM and 0.1 µM disulfiram.

2.13. Statistical Analyses

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed on non-normalized data using Friedman, Mann–Whitney or Kruskal–Wallis non-parametric tests and post hoc Dunn’s multiple comparisons test. Statistics were performed with GraphPad PrismVR version 7.02 or R version 3.6.3 (<https://www.r-project.org/>, accessed on 29 March 2021). Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant (NS: not significant).

3. Results

3.1. Pesticide Exposure Induces DNA Damage in Normal BM-MSCs

A dose-dependent decrease in the amplification of viable normal BM-MSCs was observed after 21 days of culture continuously exposed in vitro to pesticides, as described previously [9,10]. At D21, untreated cells presented a major amplification ($15,016 \pm 4761$ fold-increase). By comparison to this control condition (100%), the amplification rate was significantly lower after pesticide exposure (hNDI: $46 \pm 4\%$, $p < 0.0001$; ADI: $44 \pm 5\%$, $p < 0.0001$ and 3ADI: $22 \pm 3\%$, $p < 0.0001$) (Figure 1A). This decreased amplification was associated with features of cell suffering, mainly at the 3ADI dose, as shown by bright field microscopy and forward-scatter and side-scatter flow cytometry plots (Figure 1B,C).

Concomitantly, pesticides induced a significant dose-dependent increase in senescence (vs. control condition: hNDI: 2.9 ± 0.4 fold-increase, $p = 0.0038$; ADI: 3.4 ± 0.6 fold-increase, $p = 0.0030$; 3ADI: 4.9 ± 1.0 fold-increase, $p < 0.0001$) (Figure 1D,E). These results are in accordance with those published by our research consortium [9] and validate the experimental model and the chemical activities of pesticides used in the present study.

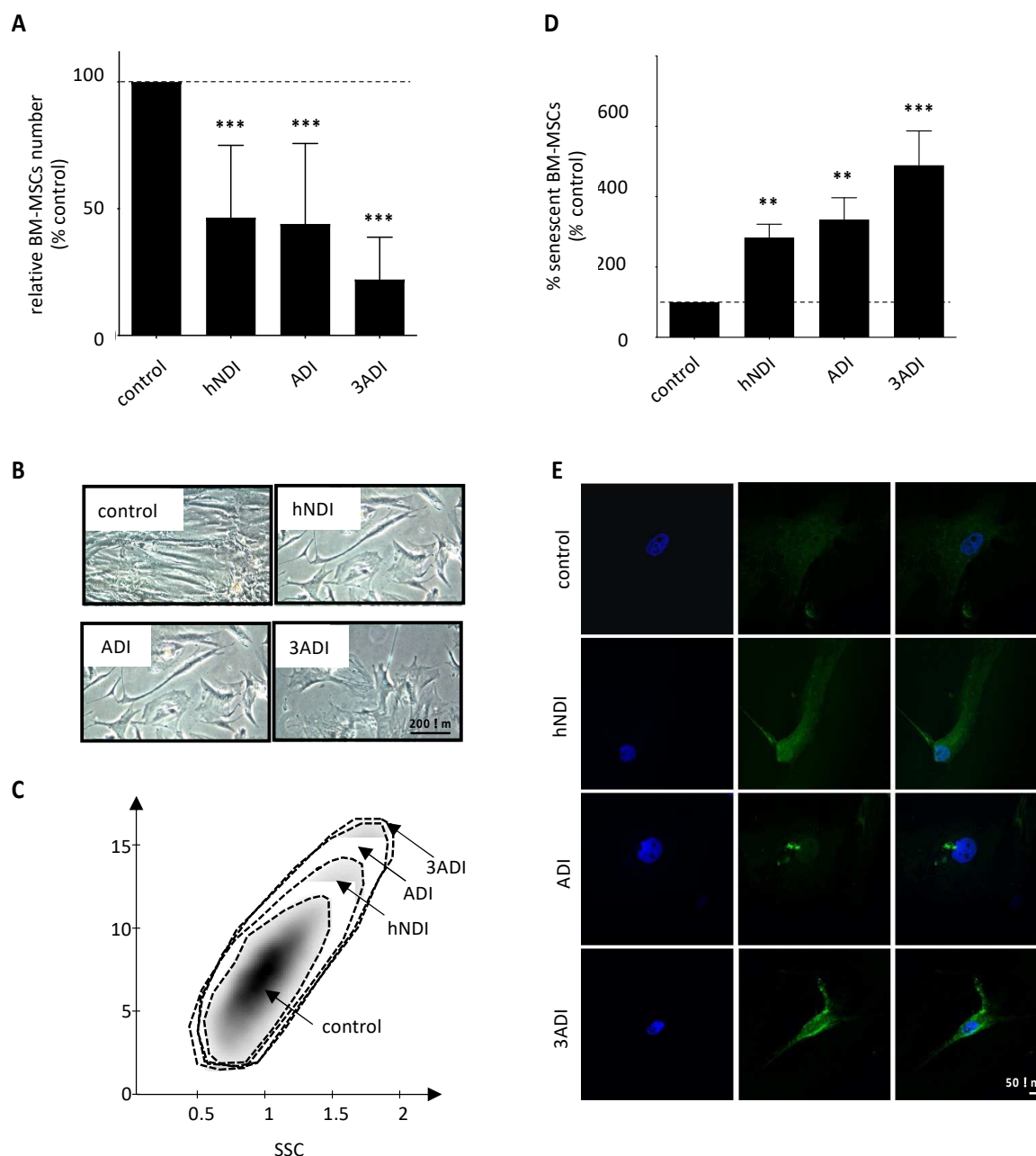


Figure 1. BM-MSCs enumeration and senescence are impacted after 21 days of pesticide exposure. (A) BM-MSCs enumeration (Trypan blue exclusion method) indicates a lower number of cells after exposure to pesticides (hNDI, ADI, 3ADI, $n = 36$) for 21 days in vitro. (B) Representative bright-field micrographs of BM-MSCs after 21 days of exposure and (C) representative forward-scatter (FCS) and side-scatter (SSC) flow cytometry plot, revealing abnormal cell morphology after pesticides exposure. (D) β -galactosidase activity in BM-MSCs indicates a higher number of positive cells (senescent cells) after pesticide exposure ($n = 11$), and (E) anti- β -Galactosidase immunostaining confirms these results. Data are expressed as percent of the control $\pm$ SEM; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$; Friedman or Kruskal–Wallis followed by post hoc multiple comparisons test. Scalebars: 200 μ m (B) and 50 μ m (E).

Maneb and mancozeb, the pesticides most frequently identified in food samples [8], are those for which the toxicity is the most documented [30,31]. These two compounds share the same chemical structure. Mancozeb is a combination of both maneb and zineb that contains 20% of Mn and 2.5% of Zn. Both maneb and mancozeb are degraded into a main organosulfur compound, ethylene thiourea (ETU: C₃H₆N₂S), which is further degraded in ethylene urea and ethylene diamine. Consequently, their relative weight in the deleterious effect of the cocktail was determined in separate experiments by comparing the amplification rate of BM-MSCs after 21 days exposure to maneb alone, mancozeb alone and a cocktail with the five other pesticides (chlorpyrifos ethyl, dimethoate, diazinon, iprodione and imazalil). None of these three exposure conditions was able to recapitulate the effect observed with low doses of the complete mix, suggesting their additive and/or synergistic toxicity (Figure S1). Finally, HPLC analyses were performed to study the capacity of BM-MSC to metabolize maneb, mancozeb and diazinon, and these cells were not able to produce metabolites of interest (Figure S3).

The impact on DNA damage of the oxidative stress-induced senescence after exposure to the low-dose pesticide mix was evaluated by three different methods. The induction of DNA double strand breaks was appeared to be higher after pesticide exposure, by the dose-dependent increase in phospho-S139 γ H2AX quantification by flow cytometry (vs. control condition: hNDI: 1.29 ± 0.2 fold-increase, NS; ADI: 2.15 ± 0.1 fold-increase, $p = 0.0201$; 3ADI: 1.74 ± 0.2 fold-increase, $p = 0.0015$) (Figure 2A). DNA fragmentation was confirmed by comet assay (Figure 2A). Finally, DNA integrity was evaluated by confocal microscopy studying the foci, focused on the recruitment of 53BP1 and MDC1 on the DNA damage sites identified by phospho-S139 γ H2AX staining. In the control condition, the culture of BM-MSCs for 21 days induced a few small and discrete nuclear foci with adequate recruitment of 53BP1 and MDC1. As presented in Figure 2B, whatever the dose, pesticide exposure clearly increased the number and size of foci. As expected, 53BP1 colocalized with phospho-S139 γ H2AX, while a defective nuclear recruitment of MDC1 was observed. These results suggest that the double strand DNA breaks induced by pesticide exposure could be due to defective DNA repair.

3.2. Pesticide Cocktail Alters ALDH2 Expression and Activity, Inducing Acetaldehyde Accumulation in BM-MSCs

DNA breaks result from various molecular mechanisms, especially from the cellular accumulation of such toxic metabolites as acetaldehyde (Figure 3A) [32]. Pesticide exposure significantly increased acetaldehyde levels in BM-MSCs (vs. control condition: hNDI: 1.4 ± 0.2 fold-increase, $p = 0.0319$; ADI: 1.5 ± 0.3 fold-increase, $p = 0.0304$; 3ADI: 1.4 ± 0.1 fold-increase, $p = 0.0010$) (Figure 3B). Acetaldehyde is detoxified in acetate [33] and, as expected, a concomitant decrease in acetate level was observed in the experimental conditions (Figure 3C). These results led us to focus on ALDH2 to explain the decrease in acetaldehyde catabolism.

ALDH2 gene expression was quantified by RT-qPCR. Comparatively to the control condition (100%), pesticide exposure significantly decreased ALDH2 mRNA levels (hNDI: $31 \pm 8\%$, $p = 0.0030$; ADI: $31 \pm 1\%$, $p = 0.0355$; 3ADI: $31 \pm 1\%$, $p = 0.0015$) (Figure 3D). The decrease in ALDH2 production was confirmed at the protein and functional levels (Figure 3E and 3F, respectively). The other members of the ALDH superfamily (Table S3), known to be expressed in MSCs, were also quantified and their levels were not modified by pesticide exposure (Figure S2).

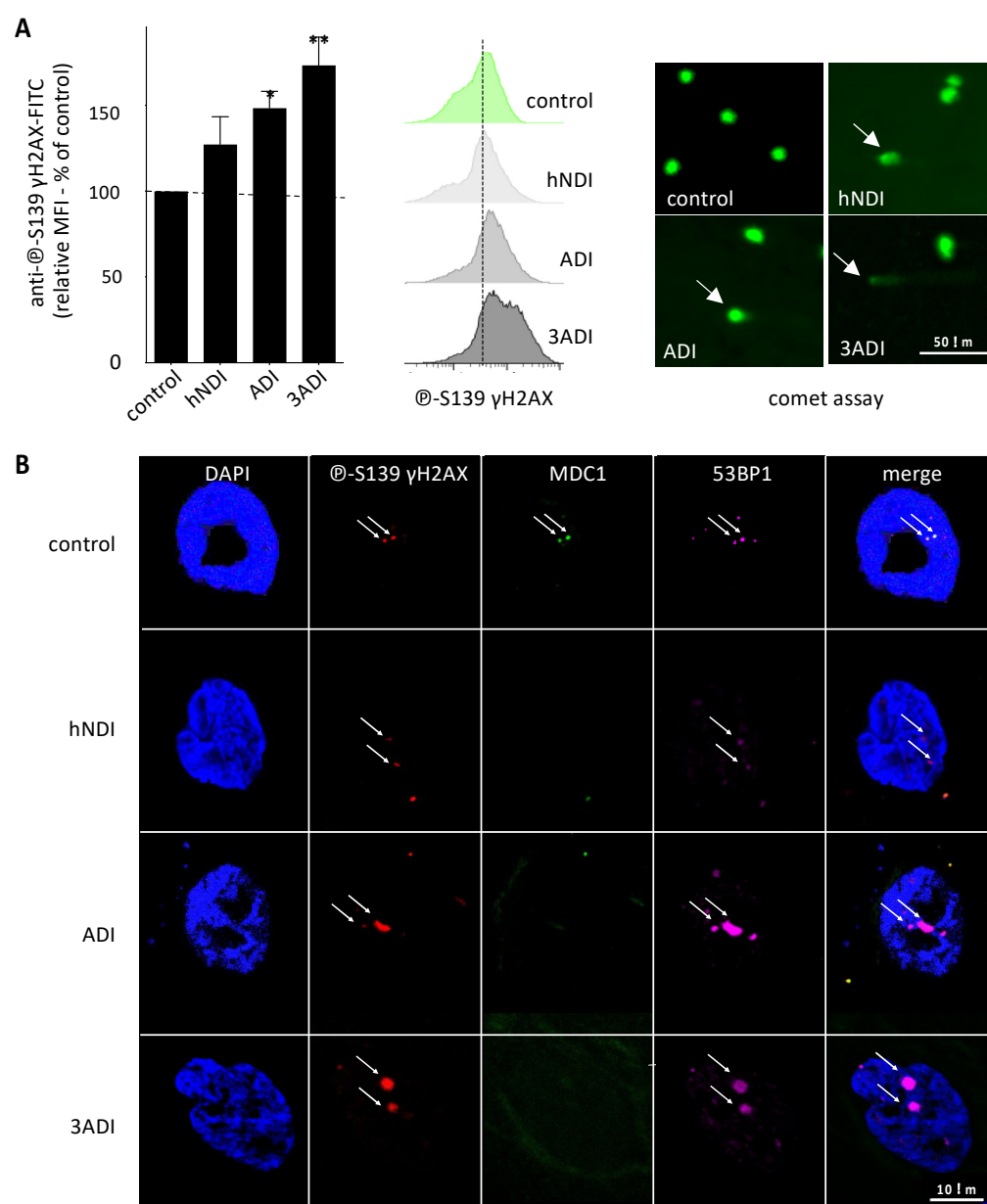


Figure 2. Pesticide exposure for 21 days induces DNA damage in normal BM-MSCs. (A) DNA damage with double strand breaks, quantified by $\text{p-S139-}\gamma\text{H2AX}$ immunoreactivity by flow cytometry, increases in BM-MSCs after pesticide exposure for 21 days (left panel, $n = 6$), as shown in a representative experiment (middle panel). Comet assays reveal increased nucleus DNA migration after exposure of BM-MSCs to pesticides for 21 days, as shown in a representative experiment (right panel). (B) $\text{p-S139 } \gamma\text{H2AX}$, 53BP1, MDC1 triple immunostaining in BM-MSCs indicates a higher number of double positive 53BP1/ $\text{p-S139 } \gamma\text{H2AX}$ signals in the nucleus of exposed cells (FOCI) and a loss of MDC1 staining. Data are expressed as percent of the control $\pm$ SEM; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; Friedman followed by post hoc Dunn's multiple comparisons test. Scalebar: 50 μm (A) and 10 μm (B).

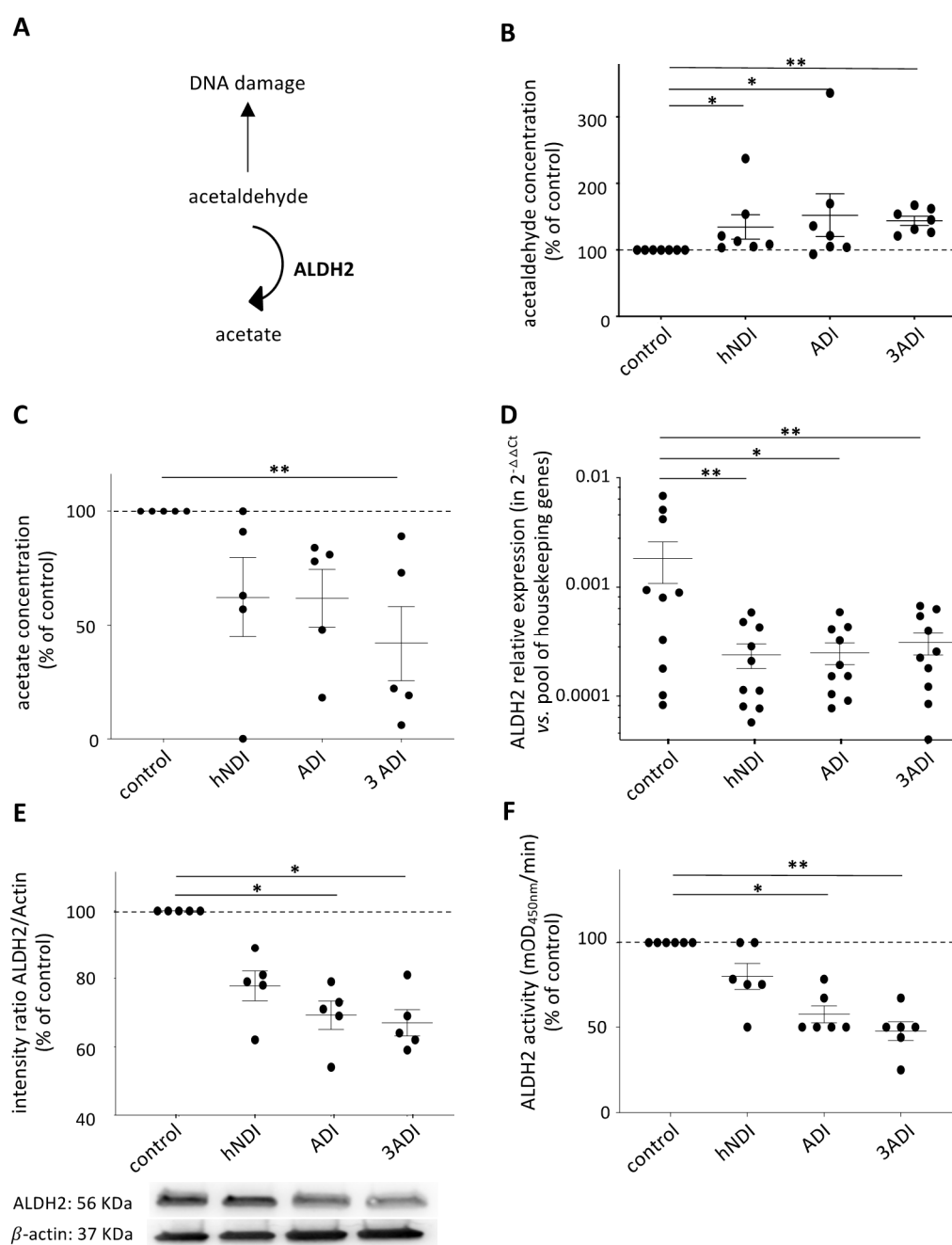


Figure 3. Mitochondrial acetaldehyde catabolism is altered after 21 days of exposure to pesticides. (A) Schematic representation of mitochondrial acetaldehyde catabolism via the ALDH2 enzyme. (B) Acetaldehyde (ALDH2 substrate) quantified by spectroscopy, is increased in exposed BM-MSCs ($n = 7$), and, concomitantly, (C) acetate concentration (ALDH2 product), is decreased in these cells ($n = 5$), indicating abnormal catabolism of acetaldehyde to acetate. (D) The analysis of ALDH2 relative expression indicates a strong decreased of ALDH2 mRNA abundance in case of exposure to pesticides ($n = 10$). (E) ALDH2 protein quantification by western blot also reveals a decreased ALDH2 production ($n = 6$). (F) Finally, ALDH2 enzymatic activity, quantified by spectroscopy, is decreased in BM-MSCs exposed to pesticides ($n = 6$). Data are expressed as percent of the control $\pm$ SEM; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; Friedman or Kruskal–Wallis followed by post hoc multiple comparisons test. The uncropped western blot images can be found in Figure S4.

3.3. ALDH2 Inactivation by Disulfiram Induces Senescence and DNA Damage in BM-MSCs

The CrispR-Cas9 knock-out strategy was used to validate the implication of ALDH2 in the alterations of BM-MSCs observed after pesticide exposure, regarding proliferation, senescence and DNA damage. This strategy allowed efficient invalidation of *ALDH2* gene at the mRNA and protein levels (Figure 4A, left panel). This genetic modification induced an important lethality in BM-MSCs from D2 on (Figure 4A, right panel), impairing the use of this approach in the experimental system of pesticide exposure, ALDH2 being essential for cell survival [28].

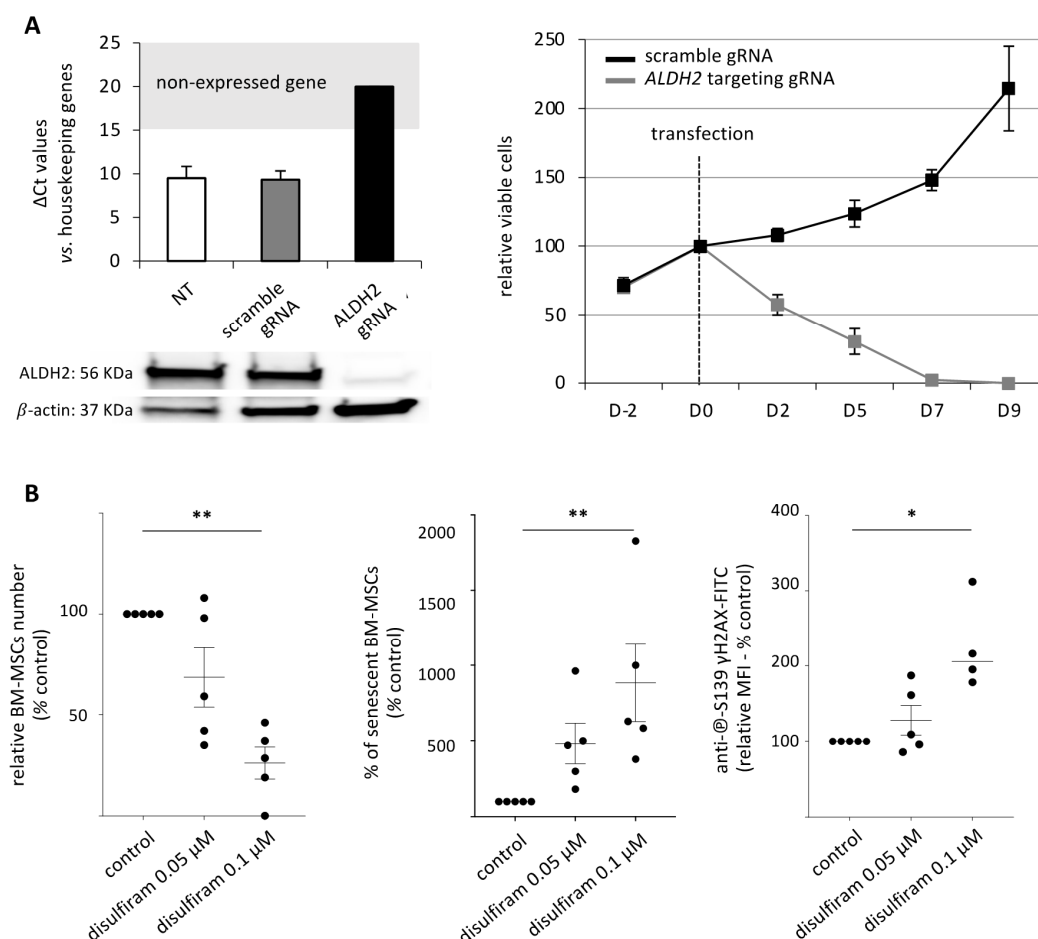


Figure 4. ALDH2 inhibition reproduces the consequences of pesticide exposure on BM-MSCs. (A) CrispR Cas9 based ALDH2 invalidation was checked by RT-qPCR and western blot analyses (left panel). ALDH2 invalidation in BM-MSCs induces cell death (right panel), ruling out the use of this strategy in the model. (B) Disulfiram, an inhibitor of ALDH2 activity, decreases the relative BM-MSCs number ($n = 5$), increases senescence ($n = 4$) and double strand DNA damage ($n = 5$), as quantified by anti- $\oplus$ -S139 γ H2AX immunoreactivity. Data are expressed as percent of the control $\pm$ SEM; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; Friedman followed by post hoc Dunn's multiple comparisons test. The uncropped western blot images can be found in Figure S5.

Since the Crispr/Cas9 knockdown ALDH2 gene expression was not usable, a pharmacological inhibition strategy was then tested using disulfiram. At D14 of disulfiram exposure (0.1 μ M), a significant decrease of viable BM-MSCs ($26 \pm 8\%$ of the control condition, $p = 0.0089$; Figure 4B, left panel), increased senescence ($883.5 \pm 256\%$ of the control condition, $p = 0.0031$; Figure 4B, middle panel) and increased DNA damage ($125 \pm 30\%$ of the control condition, $p = 0.0165$, Figure 4B, right panel) were observed. These effects were initiated with lower doses of disulfiram (0.05 μ M). Altogether, these results reinforce the role of ALDH2 involvement in the senescence and DNA damage processes observed after pesticide exposure.

3.4. Pesticide Exposure Alters the Functional Capacity of BM-MSCs to Support Primitive Hematopoiesis

MSCs of the BM microenvironment play critical roles in primitive hematopoiesis to allow for the self-renewal and commitment of hematopoietic stem progenitor cells (HSPC). Their support of primitive hematopoiesis is classically well evaluated by CAFC limiting dilution assays [34]. The impact of low doses of pesticides on the microenvironment was consequently investigated, using human CD34⁺ HSPC cocultured for 1 week (D21 to D28) with BM-MSCs previously exposed or not (control condition) to low doses of pesticides (hNDI) for 21 days. On D28, CD34⁺ cells were FACS-sorted and then plated on the MS5 stromal cell line for 5 weeks to quantify CAFC frequency in CD34⁺ cells and their clonogenic capacity. Of note, pesticides were used exclusively during the 3 weeks of BM-MSCs expansion, before the co-culture with normal CD34⁺ cells. Consequently, normal hematopoietic cells were never directly exposed to them (Figure 5A).

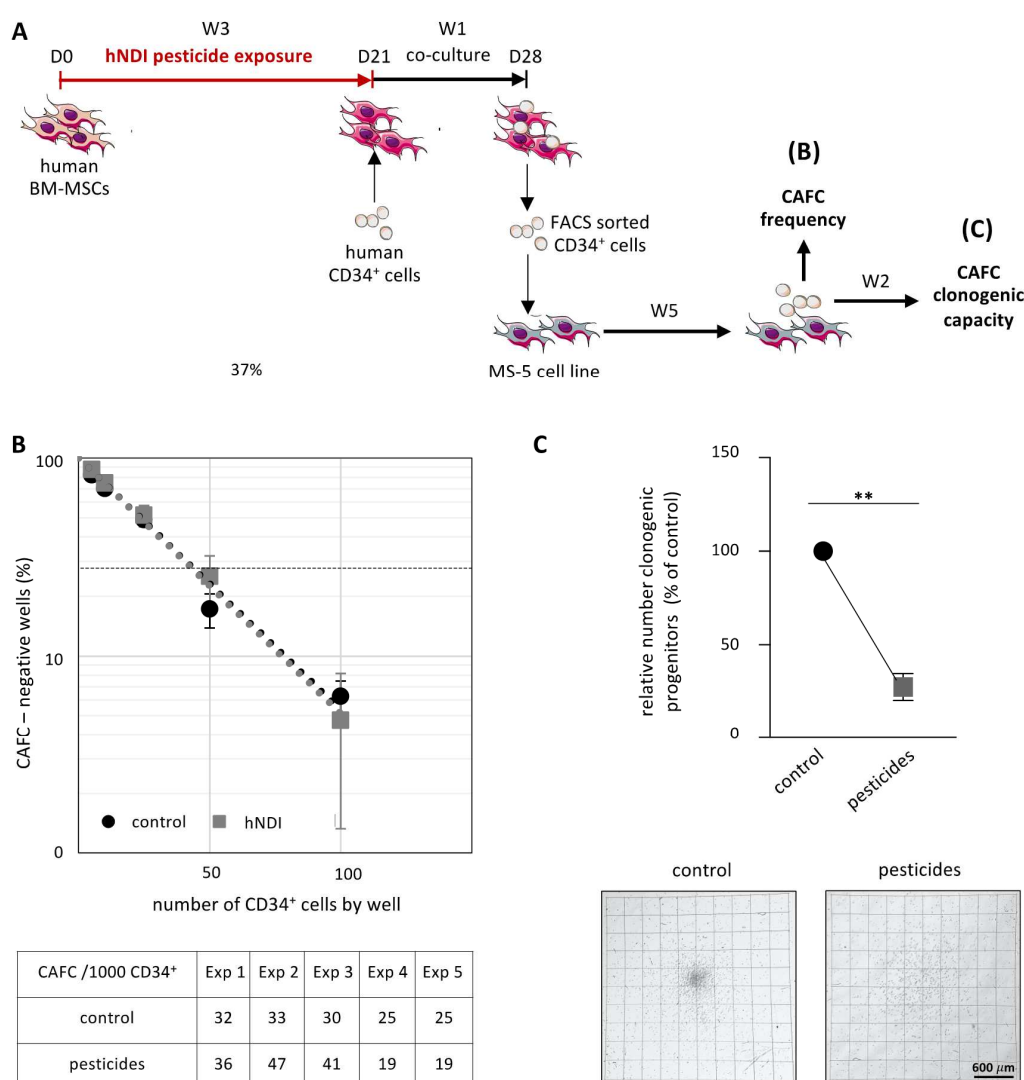


Figure 5. Exposure of BM-MSCs to pesticides alters the functionality of primitive hematopoietic progenitors. Human CD34⁺ cells were co-cultured for 7 days on BM-MSCs previously exposed or not for 21 days to low doses of pesticides (hNDI), and CAFC frequency was quantified by limiting dilution assays after 5 weeks on the MS-5 cell line. (A) Schematic representation of the experimental strategy. (B) Exposure of BM-MSCs to pesticides does not modify the frequency of CAFC in CD34⁺ cells ($n = 5$). (C) Exposure of BM-MSCs to pesticides induces a major decrease in the clonogenic capacity (CFU-GM, BFU-E and CFU-M) of CAFC ($n = 5$); representative morphological features of CFU-GM are shown in lower panel. Data are expressed as mean $\pm$ SEM; ** $p < 0.01$; Mann–Whitney test. Scalebar: 600 μ m.

The frequency of CAFC in CD34⁺ cells was not modified by the exposure of BM-MSCs to pesticides (32 ± 6 CAFC/1000 CD34⁺ cells vs. 29 ± 2 CAFC/1000 CD34⁺ cells in the control condition) (Figure 5B). Nevertheless, previous pesticide exposure of the BM-MSCs altered their functionality, as shown by the 2.9-fold decrease of the CAFC clonogenic capacity (1.8 ± 0.6 clonogenic progenitors/CAFC, vs. 5.1 ± 1.3 clonogenic progenitors/CAFC in the control condition, $p = 0.0003$), associated with alterations in the size/morphology of the colonies generated (Figure 5C). Altogether, these results are in favor of an impairment of the maturation process of HSPC when in contact with BM-MSCs altered by low doses of pesticides.

Increased senescence of BM-MSCs and decreased HSPC clonogenic capacity are well established in patients suffering from MDS [13]. We thus focused on ALDH2 and DNA damage in primary BM-MSCs from MDS patients (Table S1), given our findings on pesticide exposure of such cells. When compared to BM-MSCs from healthy volunteers (100%), MDS BM-MSCs displayed a significantly lower ALDH2 expression ($28 \pm 5\%$, $p = 0.0080$) (Figure 6A) and enzymatic activity ($76 \pm 7\%$, $p = 0.0152$) (Figure 6B). Double strand breaks DNA were observed in these cells both by flow cytometry and comet assay, mimicking the results obtained after pesticide exposure of BM-MSCs from healthy volunteers (Figure 6C).

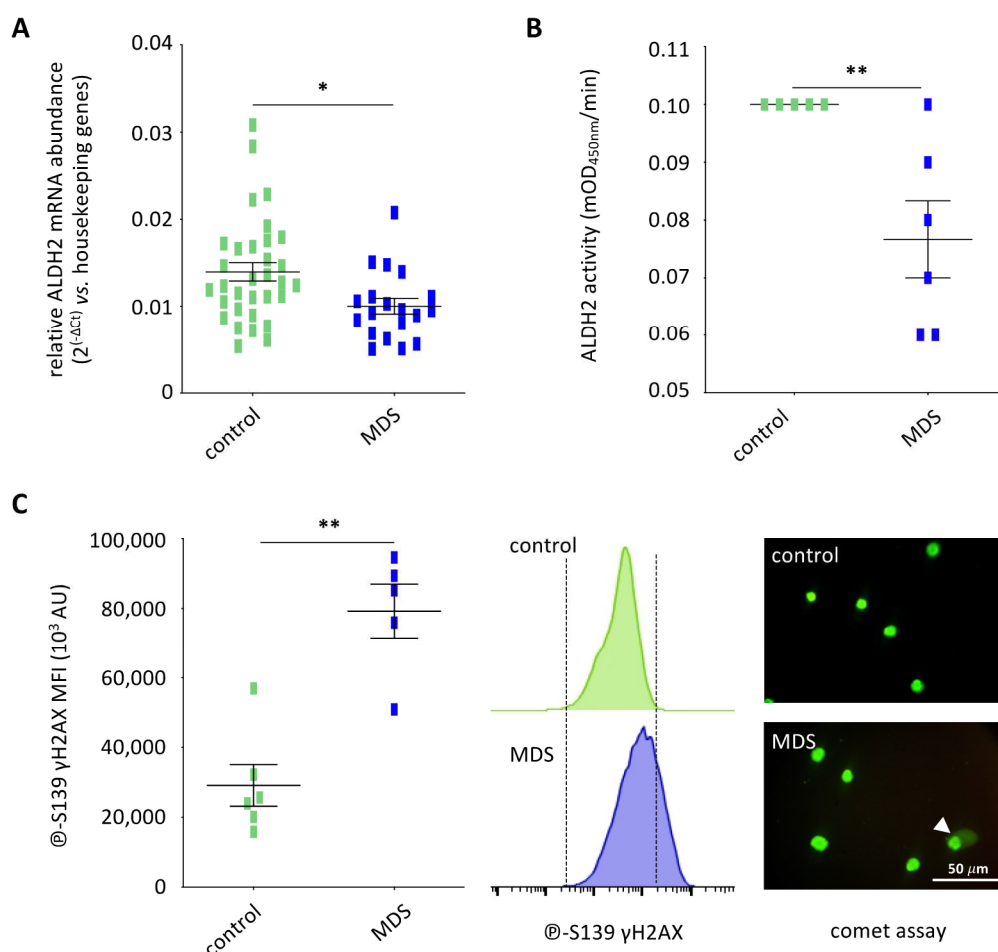


Figure 6. The ALDH2 pathway is altered in BM-MSCs from MDS patients. (A) ALDH2 expression is decreased in primitive MDS BM-MSCs, without in vitro exposure to pesticides (control BM-MSCs, $n = 32$; MDS BM-MSCs, $n = 20$). (B) ALDH2 activity is decreased in MDS BM-MSCs compared to control BM-MSCs ($n = 6$). (C) @-S139 γ H2AX quantification by flow cytometry shows increased double strand breaks in MDS BM-MSCs compared to normal BM-MSCs (left panel, $n = 6$), as shown in a representative experiment (middle panel). A representative experiment shows an increased nucleus DNA migration in MDS-BM-MSCs compared to control BM-MSCs by comet assays (right panel). Data are expressed as mean $\pm$ SEM; *, $p < 0.05$; Mann–Whitney test. Scalebar: 50 μ m.

4. Discussion

The relationship between occupational exposure to high-dose pesticides and the occurrence of various diseases is well established, notably in hematological malignancies, as we recently reported in AML [4,6,35]. Moreover, the increasing use of pesticides since the 90's has led to a contamination of water, fruits and vegetables, resulting in a daily exposure of the general population to residues from several pesticides [8]. The possible deleterious effects of low doses pesticides thus have to be studied. Our research consortium has already previously modeled in vitro what could be lifelong pesticide exposure, using a cocktail combining low doses of the seven pesticides frequently found in food and water by EFSA [8–10]. Three of them (diazinon, chlorpyrifos, mancozeb) have been reported to be associated with the occurrence of leukemia [36–38]. Here, we analyzed the in vitro effect of these low doses on primary BM-MSCs, focusing on potential DNA damage and their impact on primitive hematopoiesis control. The cocktail of pesticides used in our study (imidazole: imazalil/dithiocarbamates: maneb and mancozeb/dicarboximide: iprodione/organophosphates: chlorpyrifos ethyl, diazinon and dimethoate) is considered to be genotoxic [39–45] and classically associated with oxidative stress, an important cause of genotoxicity [46]. To date, no direct DNA binding has been reported for these pesticides. A direct DNA binding of pesticides was only described for organochlorinated pesticides, notably hexachlorocyclohexanes [47], which first bind to DNA bases via Van der Waals forces and halogen bonds. This induces an increase in helicity and base pair accumulation, as well as a more compacted structure of DNA which exposes more sites susceptible to promote DNA degradation through DNase I.

Direct consequences of BM-MSCs exposure to pesticides, already reported, are dose-dependent senescence and decreased proliferation [9]. These results have been confirmed here, thus validating the experimental system. Low doses of pesticides promote an increase in reactive oxygen species (ROS) and stress-induced senescence in BM-MSCs [9] which can be explained by DNA damage, a well described consequence of exposure to pesticides [48–50]. Aiming to precise the incidence of pesticide cocktail on the machinery of DNA repair, we analyzed foci (i.e., phospho-S139 γ H2AX, 53BP1 and MDC1 colocalization) by confocal microscopy. This exposure of BM-MSCs promoted a lack of MDC1 recruitment in the foci, a feature reported to slow the mitosis process [51]. This could explain the decreased proliferation of exposed BM-MSCs. Of note, 53BP1 recruitment was not affected. The presence of 53BP1 in DNA damage foci might be explained by its binding to γ H2AX in an MDC1-independent manner [52].

Acetaldehyde is known to induce ROS in various cell types, [53,54] and its accumulation in hematopoietic stem cells causes double strand DNA breaks [32]. The ALDH enzyme family is involved in the detoxification of aldehydes, playing a major role in cell survival, protection and differentiation, [55] and an interesting relationship has been established between ALDH and pesticides toxicity, notably mancozeb or maneb, in the pathophysiology of Parkinson's and Alzheimer's diseases [56,57]. The cellular acetaldehyde level is controlled by ALDH2, which detoxifies it into acetate [33]. The altered phenotype of BM-MSCs exposed to low dose pesticides that was observed here can be explained by the concomitant decrease in ALDH2 activity and increase in acetaldehyde levels in these cells. ALDH2 has been reported to be crucial in murine hematopoiesis [32,58]. In Asian populations, a functional ALDH2 polymorphism (ALDH2; rs671, Glu504Lys) is highly prevalent [59–61] and suspected to be related to an accelerated progression of bone marrow failure and malignant transformation in Fanconi anemia patients [62,63].

That ALDH2 deficiency in exposed BM-MSCs was shown here to impact their functional capacity to support primitive hematopoiesis. These cells did not alter the capacity of CD34⁺ to produce CAFC but the generation of clonogenic progenitors (BFU-E, CFU-M and CFU-GM) was severely decreased, demonstrating functional alterations of pretreated BM-MSCs in primitive hematopoiesis control. These results are consistent with data from mouse models where long-term exposure at high doses of agricultural pesticides decreased the proliferation and functional maturation of BM stem cells and hematopoietic progeni-

tors [64,65]. Modifications in the clonogenic and differentiating capacities of hematopoietic progenitors have also been reported in mice exposed to low doses of a mix of 6 pesticides [66]. In humans, OPE to high doses of pesticides increases the risk of MDS [4], characterized by an ineffective hematopoiesis [67] and a reduced clonogenic capacity of HSPC [13]. Our study indicates that such reported in vivo observations could be explained, at least partly, by a primitive hematopoiesis supportive defect of the BM microenvironment exposed to low doses of pesticides. Our group recently published that about 40% of healthy subjects older than 50 years present clonal hematopoiesis [68]. The risk of developing a myeloid disorder (MDS, AML) by these subjects is increased but hopefully low, suggesting a multifactorial pathophysiology which may include environmental impact. This assumption is supported by the observation, in this study, of an underexpression of ALDH2 and an increase in acetaldehyde concentration in primary BM-MSCs from MDS patients. This suggests that normal BM-MSCs lifelong exposed to low-doses of pesticides may contribute to the pathogenesis of MDS. The hypothesis of a role of ALDH2 deficiency in such diseases is reinforced by a significantly younger median age at MDS diagnosis in Japanese than in western countries, [69,70] and by higher risk of AML after OPE in Asian population [6].

5. Conclusions

In conclusion, a new consequence of low-dose pesticide exposure on normal BM-MSCs is reported here, namely a decrease in ALDH2 enzyme production and activity. This induces an accumulation of cellular acetaldehyde, DNA damage and a decreased ability to support primitive hematopoiesis. Normal BM-MSCs exposed to pesticides and primary BM-MSCs from MDS patients present similar abnormalities, suggesting that a lifelong exposure to pesticide residues could promote the development of MDS through ALDH2 alterations in BM-MSCs.

This study has several limitations. The main limitation is the in vitro model with estimated theoretical concentrations in bone marrow cells. These results constitute a basis for future experimentations, notably in vivo experiments describing hematopoiesis in aged mice (at least 2 years) life-long exposed to low doses of the cocktail of seven pesticides. Finally, the decreased expression of ALDH2 in BM-MSCs from MDS patients leads us to hypothesize that this enzyme could be involved in MDS pathophysiology, without definitive conclusion. The relationship between pesticides exposure, ALDH2 decrease and MDS risk will require further biological and epidemiological studies.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13225699/s1>. Figure S1: The cocktail effect of pesticides is required to induce a decrease in viable BM-MSCs, Figure S2: Pesticide cocktail exposure for 21 days does not modify aldehyde dehydrogenase-related genes expression in BM-MSCs, Figure S3: Quantification by HPLC of metabolites of maneb, mancozeb and diazinon, Figure S4: Uncropped western blot images for Figure 3, Figure S5: Uncropped western blot images for Figure 4, Table S1: Characteristics of MDS patients and healthy volunteers, Table S2: Doses of pesticides, Table S3: ALDH family characteristics.

Author Contributions: Conceptualization, O.H.; methodology, O.H.; software, A.F., N.R. and F.P.; validation, C.O., F.V. and O.H.; formal analysis, N.V., A.F., E.G., F.P., J.B. (Joevin Besombes) and J.B. (Jérôme Bourgeais), J.D., J.L., M.C.B., N.G., N.R., P.L. and O.H.; investigation, A.F., F.P., J.B. (Joevin Besombes) and J.B. (Jérôme Bourgeais), N.R., L.B., N.G., P.L. and S.H.; resources, C.O., E.G., F.V., J.D. and O.H.; data curation, O.H.; writing—original draft preparation, A.F. and O.H.; writing—review and editing, M.C.B.; visualization, O.H.; supervision, O.H.; project administration, O.H.; funding acquisition, F.V., P.L. and O.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grants from French Cancéropôle Grand-Ouest (AOS 2016/PENICA project).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Tours university hospital (HEALTHOX protocol: Clinicaltrials.gov # NCT02789839, 2016-06-03; MYLESYM protocol, CPP Tours and AFSSAPS: 2011-A00262-39).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Cancéropôle Grand-Ouest, the International Rotary Club of Blois, “Les Sapins de l’Espoir Contre le Cancer” and CANCEN French associations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

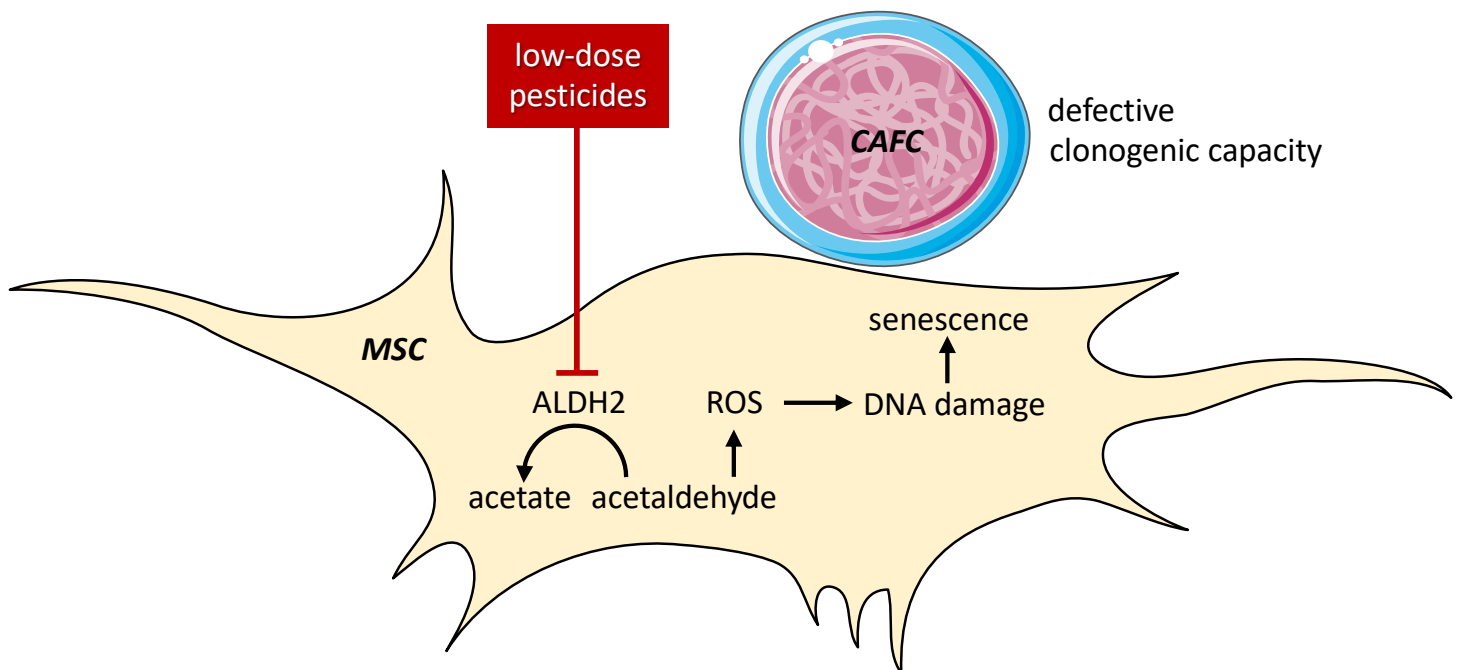
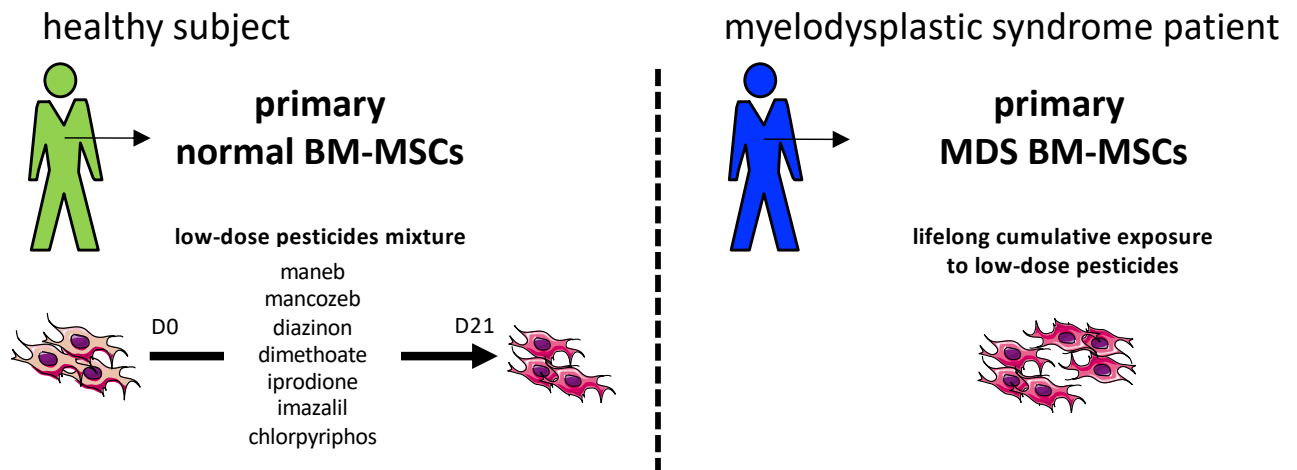
References

1. FAO (Food & Agriculture Organisation). 2016. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize> (accessed on 16 March 2018).
2. Kim, K.-H.; Kabir, E.; Jahan, S.A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **2017**, *575*, 525–535. [CrossRef] [PubMed]
3. Inserm. *Pesticides et Effets sur la Santé: Nouvelles Données. Collection Expertise Collective*; EDP Sciences: Montrouge, France, 2021.
4. Jin, J.; Yu, M.; Hu, C.; Ye, L.; Xie, L.; Jin, J.; Chen, F.; Tong, H. Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: A meta-analysis based on 1942 cases and 5359 controls. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e110850. [CrossRef]
5. Nisse, C.; Haguenoer, J.M.; Grandbastien, B.; Preudhomme, C.; Fontaine, B.; Brillet, J.M.; Lejeune, R.; Fenaux, P. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br. J. Haematol.* **2001**, *112*, 927–935. [CrossRef]
6. Foucault, A.; Vallet, N.; Gyan, E.; Herault, O. Occupational pesticides exposure is associated with an increased risk of acute myeloid leukemia: A meta-analysis of case-control studies including 2981 patients and 248705 controls. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2007. [CrossRef]
7. Alavanja, M.C.R. Introduction: Pesticides use and exposure, extensive worldwide. *Rev. Environ. Health* **2009**, *24*, 303–309. [CrossRef]
8. EFSA. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* **2020**, *18*, 6057.
9. Hochane, M.; Trichet, V.; Pecqueur, C.; Avril, P.; Oliver, L.; Denis, J.; Brion, R.; Amiaud, J.; Pineau, A.; Naveilhan, P.; et al. Low-dose pesticide mixture induces senescence in normal mesenchymal stem cells (MSCs) and promotes tumorigenic phenotype in premalignant MSC. *Stem Cells* **2017**, *35*, 800–811. [CrossRef]
10. Leveque, X.; Hochane, M.; Geraldo, F.; Dumont, S.; Gratas, C.; Oliver, L.; Gaignier, C.; Trichet, V.; Layrolle, P.; Heymann, D.; et al. Low-dose pesticide mixture induces accelerated mesenchymal stem cell aging in vitro. *Stem Cells* **2019**, *37*, 1083–1094. [CrossRef]
11. Blau, O.; Hofmann, W.K.; Baldus, C.D.; Thiel, G.; Serbent, V.; Schumann, E.; Thiel, E.; Blau, I.W. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **2007**, *35*, 221–229. [CrossRef] [PubMed]
12. Chen, Q.; Yuan, Y.; Chen, T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 293–298. [CrossRef]
13. Geyh, S.; Öz, S.; Cadeddu, R.-P.; Fröbel, J.; Brückner, B.; Kündgen, A.; Fenk, R.; Bruns, I.; Zilkens, C.; Hermsen, D.; et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia* **2013**, *27*, 1841–1851. [CrossRef]
14. Geyh, S.; Rodriguez-Paredes, M.; Jäger, P.; Khandanpour, C.; Cadeddu, R.-P.; Gutekunst, J.; Wilk, C.M.; Fenk, R.; Zilkens, C.; Hermsen, D.; et al. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2016**, *30*, 683–691. [CrossRef] [PubMed]
15. Von der Heide, E.K.; Neumann, M.; Vosberg, S.; James, A.R.; Schroeder, M.P.; Ortiz-Tanchez, J.; Isaakidis, K.; Schlee, C.; Luther, M.; Jöhrens, K.; et al. Molecular alterations in bone marrow mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* **2017**, *31*, 1069–1078. [CrossRef]
16. Walkley, C.R.; Olsen, G.H.; Dworkin, S.; Fabb, S.A.; Swann, J.; McArthur, G.A.; Westmoreland, S.V.; Chambon, P.; Scadden, T.; Purton, L.E. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by RAR γ deficiency. *Cell* **2008**, *129*, 1097–1110. [CrossRef] [PubMed]
17. Raaijmakers, M.H.G.P.; Mukherjee, S.; Guo, S.; Zhang, S.; Kobayashi, T.; Schoonmaker, J.A.; Ebert, B.L.; Al-Shahrour, F.; Hasserjian, R.P.; Scadden, E.O.; et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **2010**, *464*, 852–857. [CrossRef] [PubMed]
18. Kode, A.; Mosialou, I.; Manavalan, S.J.; Rathinam, C.V.; Friedman, R.A.; Teruya-Feldstein, J.; Bhagat, G.; Berman, E.; Kousteni, S. FoxO1-dependent induction of acute myeloid leukemia by osteoblasts in mice. *Leukemia* **2016**, *30*, 1–13. [CrossRef]

19. Dong, L.; Yu, W.-M.; Zheng, H.; Loh, M.L.; Bunting, S.T.; Pauly, M.; Huang, G.; Zhou, M.; Broxmeyer, H.E.; Scadden, D.T.; et al. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. *Nature* **2016**, *539*, 304–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Delorme, B.; Charbord, P. Culture and characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Med.* **2007**, *140*, 67–81.
21. Herault, O.; Hope, K.J.; Deneault, E.; Mayotte, N.; Chagraoui, J.; Wilhelm, B.T.; Cellot, S.; Sauvageau, M.; Andrade-Navarro, M.A.; Hébert, J.; et al. A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 895–901. [[CrossRef](#)]
22. Kouzi, F.; Zibara, K.; Bourgeais, J.; Picou, F.; Gallay, N.; Brossaud, J.; Dakik, H.; Roux, B.; Hamard, S.; Le Nail, L.-R.; et al. Disruption of gap junctions attenuates acute myeloid leukemia chemoresistance induced by bone marrow mesenchymal stromal cells. *Oncogene* **2019**, *39*, 1198–1212. [[CrossRef](#)]
23. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, 1–12, research0034. [[CrossRef](#)]
24. Desbourdes, L.; Javary, J.; Charbonnier, T.; Ishac, N.; Bourgeais, J.; Iltis, A.; Chomel, J.-C.; Turhan, A.; Guilloton, F.; Tarte, K.; et al. Alteration analysis of bone marrow mesenchymal stromal cells from de novo acute myeloid leukemia patients at diagnosis. *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 709–722. [[CrossRef](#)]
25. Issaad, C.; Croisille, L.; Katz, A.; Vainchenker, W.; Coulombel, L. A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34+/CD38− progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* **1993**, *81*, 2916–2924. [[CrossRef](#)]
26. Benboubker, L.; Binet, C.; Cartron, G.; Bernard, M.-C.; Clement, N.; Delain, M.; Degenne, M.; Desbois, I.; Colombat, P.; Domenech, J. Frequency and differentiation capacity of circulating LTC-IC mobilized by G-CSF or GM-CSF following chemotherapy: A comparison with steady-state bone marrow and peripheral blood. *Exp. Hematol.* **2002**, *30*, 74–81. [[CrossRef](#)]
27. Concordet, J.-P.; Haeussler, M. CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W242–W245. [[CrossRef](#)]
28. Wang, F.; Guo, T.; Jiang, H.; Li, R.; Wang, T.; Zeng, N.; Dong, G.; Zeng, X.; Li, D.; Xiao, Y.; et al. A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Mol. Genet. Genom.* **2018**, *293*, 769–783. [[CrossRef](#)]
29. Lipsky, J.J.; Shen, M.L.; Naylor, S. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *130–132*, 93–102. [[CrossRef](#)]
30. Domico, L.M.; Zeevalk, G.D.; Bernard, L.P.; Cooper, K.R. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology* **2006**, *27*, 816–825. [[CrossRef](#)]
31. Hoffman, L.; Trombetta, L.; Hardej, D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides maneb and mancozeb cause metal overload in human colon cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, *41*, 78–88. [[CrossRef](#)]
32. Garaycochea, J.I.; Crossan, G.P.; Langevin, F.; Daly, M.; Arends, M.J.; Patel, K.J. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature* **2012**, *489*, 571–575. [[CrossRef](#)]
33. Vasilio, V.; Pappa, A.; Petersen, D.R. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *129*, 1–19. [[CrossRef](#)]
34. Kusadasi, N.; Koevoet, J.; van Soest, P.; Ploemacher, R. Stromal support augments extended long-term ex vivo expansion of hemopoietic progenitor cells. *Leukemia* **2001**, *15*, 1347–1358. [[CrossRef](#)]
35. Leon, M.E.; Schinasi, L.H.; Lebaillly, P.; Beane Freeman, L.E.; Nordby, K.-C.; Ferro, G.; Monnereau, A.; Brouwer, M.; Tual, S.; Baldi, I.; et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: A pooled analysis from the AGRICOH consortium. *Int. J. Epidemiol.* **2019**, *48*, 1519–1535. [[CrossRef](#)]
36. Beane Freeman, L.E.; Bonner, M.R.; Blair, A.; Hoppin, J.A.; Sandler, D.P.; Lubin, J.H.; Dosemeci, M.; Lynch, C.F.; Knott, C.; Alavanja, M.C.R. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study Cohort exposed to diazinon. *Am. J. Epidemiol.* **2005**, *162*, 1070–1079. [[CrossRef](#)]
37. Lee, W.J.; Blair, A.; Hoppin, J.A.; Lubin, J.H.; Rusiecki, J.A.; Sandler, D.P.; Dosemeci, M.; Alavanja, M.C.R. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1781–1789. [[CrossRef](#)]
38. Mills, P.K.; Yang, R.; Riordan, D. Lymphohematopoietic cancers in the United Farm Workers of America (UFW), 1988–2001. *Cancer Causes Control.* **2005**, *16*, 823–830. [[CrossRef](#)]
39. Rahman, M.F.; Mahboob, M.; Danadevi, K.; Saleha Banu, B.; Grover, P. Assessment of genotoxic effects of chlorpyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutat. Res.* **2002**, *516*, 139–147. [[CrossRef](#)]
40. Silva, M.S.; De Souza, D.V.; Alpire, M.E.S.; Malinverni, A.C.D.M.; Da Silva, R.C.B.; Viana, M.D.B.; Oshima, C.T.F.; Ribeiro, D.A. Dimethoate induces genotoxicity as a result of oxidative stress: In vivo and in vitro studies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2021**, *28*, 43274–43286. [[CrossRef](#)]
41. Muranli, F.D.G.; Kanev, M.; Ozdemir, K. Genotoxic effects of diazinon on human peripheral blood lymphocytes. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2015**, *66*, 153–158. [[CrossRef](#)]
42. Srivastava, A.K.; Ali, W.; Singh, R.; Bhui, K.; Tyagi, S.; Al-Khedhairi, A.A.; Srivastava, P.K.; Musarrat, J.; Shukla, Y. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci.* **2012**, *90*, 815–824. [[CrossRef](#)]
43. Şişman, T.; Türkez, H. Toxicologic evaluation of imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials. *Toxicol. Ind. Health* **2010**, *26*, 641–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Calviello, G.; Piccioni, E.; Boninsegna, A.; Tedesco, B.; Maggiano, N.; Serini, S.; Wolf, F.I.; Palozza, P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 87–96. [\[CrossRef\]](#)
45. Gadeva, P.; Dimitrov, B. Genotoxic effects of the pesticides rubigan, omite and rovril in root-meristem cells of *Crepis Capillaris* L. *Mutat. Res.* **2008**, *652*, 191–197. [\[CrossRef\]](#)
46. Bandyopadhyay, U.; Das, D.; Banerjee, R.K. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* **1999**, *77*, 658–666.
47. Qin, C.; Yang, B.; Zhang, W.; Ling, W.; Liu, C.; Liu, J.; Li, X.; Gao, Y. Organochlorinated pesticides expedite the enzymatic degradation of DNA. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
48. Ahmed, F.E.; Hart, R.W.; Lewis, N.J. Pesticide induced DNA damage and its repair in cultured human cells. *Mutat. Res.* **1977**, *42*, 161–173. [\[CrossRef\]](#)
49. Hreljac, I.; Zajc, I.; Lah, T.; Filipič, M. Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **2008**, *49*, 360–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Intranuovo, G.; Schiavulli, N.; Cavone, D.; Birtolo, F.; Cocco, P.; Vimercati, L.; Macinagrossa, L.; Giordano, A.; Perrone, T.; Ingravallo, G.; et al. Assessment of DNA damages in lymphocytes of agricultural workers exposed to pesticides by comet assay in a cross-sectional study. *Biomarkers* **2018**, *23*, 462–473. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Jungmichel, S.; Stucki, M. MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma* **2010**, *119*, 337–349. [\[CrossRef\]](#)
52. Baldock, R.A.; Day, M.; Wilkinson, O.J.; Cloney, R.; Jeggo, P.A.; Oliver, A.W.; Watts, F.Z.; Pearl, L.H. ATM localization and heterochromatin repair depend on direct interaction of the 53BP1-BRCT 2 domain with γ H2AX. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2081–2089. [\[CrossRef\]](#)
53. Tamura, M.; Ito, H.; Matsui, H.; Hyodo, I. Acetaldehyde is an oxidative stressor for gastric epithelial cells. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2014**, *55*, 26–31. [\[CrossRef\]](#)
54. Waris, S.; Patel, A.; Ali, A.; Mahmood, R. Acetaldehyde-induced oxidative modifications and morphological changes in isolated human erythrocytes: An in vitro study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 16268–16281. [\[CrossRef\]](#)
55. Kimura, M.; Yokoyama, A.; Higuchi, S. Aldehyde dehydrogenase-2 as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets* **2019**, *23*, 955–966. [\[CrossRef\]](#)
56. Fitzmaurice, A.G.; Rhodes, S.L.; Cockburn, M.; Ritz, B.; Bronstein, J.M. Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology* **2014**, *82*, 419–426. [\[CrossRef\]](#)
57. Kamino, K.; Nagasaka, K.; Imagawa, M.; Yamamoto, H.; Yoneda, H.; Ueki, A.; Kitamura, S.; Namekata, K.; Miki, T.; Ohta, S. Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273*, 192–196. [\[CrossRef\]](#)
58. Langevin, F.; Crossan, G.P.; Rosado, I.V.; Arends, M.J.; Patel, K.J. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* **2011**, *475*, 53–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Dandré, F.; Cassaigne, A.; Iron, A. The frequency of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase I2 (atypical) allele in Caucasian, Oriental and African black populations determined by the restriction profile of PCR-amplified DNA. *Mol. Cell Probes* **1995**, *9*, 189–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Goedde, H.W.; Agarwal, D.P.; Fritze, G.; Meier-Tackmann, D.; Singh, S.; Beckmann, G.; Bhatia, K.; Chen, L.Z.; Fang, B.; Lisker, R.; et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum. Genet.* **1992**, *88*, 344–346. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Li, H.; Borinskaya, S.; Yoshimura, K.; Kal'ina, N.; Marusin, A.; Stepanov, V.A.; Qin, Z.; Khaliq, S.; Lee, M.; Yang, Y.; et al. Refined geographic distribution of the oriental ALDH2*504Lys (nee 487Lys) variant. *Ann. Hum. Genet.* **2009**, *73*, 335–345. [\[CrossRef\]](#)
62. Hira, A.; Yabe, H.; Yoshida, K.; Okuno, Y.; Shiraishi, Y.; Chiba, K.; Tanaka, H.; Miyano, S.; Nakamura, J.; Kojima, S.; et al. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* **2013**, *122*, 3206–3209. [\[CrossRef\]](#)
63. Yabe, M.; Koike, T.; Ohtsubo, K.; Imai, E.; Morimoto, T.; Takakura, H.; Koh, K.; Yoshida, K.; Ogawa, S.; Ito, E.; et al. Associations of complementation group, ALDH2 genotype, and clonal abnormalities with hematological outcome in Japanese patients with Fanconi anemia. *Ann. Hematol.* **2019**, *98*, 271–280. [\[CrossRef\]](#)
64. Chatterjee, S.; Basak, P.; Chaklader, M.; Das, P.; Pereira, J.A.; Chaudhuri, S.; Law, S. Pesticide induced marrow toxicity and effects on marrow cell population and on hematopoietic stroma. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2013**, *65*, 287–295. [\[CrossRef\]](#)
65. Chatterjee, S.; Basak, P.; Chaklader, M.; Das, P.; Pereira, J.A.; Chaudhuri, S.; Law, S. Pesticide induced alterations in marrow physiology and depletion of stem and stromal progenitor population: An experimental model to study the toxic effects of pesticide. *Environ. Toxicol.* **2014**, *29*, 84–97. [\[CrossRef\]](#)
66. Merhi, M.; Demur, C.; Racaud-Sultan, C.; Bertrand, J.; Canlet, C.; Estrada, F.B.Y.; Gamet-Payraastre, L. Gender-linked hematopoietic and metabolic disturbances induced by a pesticide mixture administered at low dose to mice. *Toxicology* **2010**, *267*, 80–90. [\[CrossRef\]](#)
67. Bulycheva, E.; Rauner, M.; Medyouf, H.; Theurl, I.; Bornhäuser, M.; Hofbauer, L.; Platzbecker, U. Myelodysplasia is in the niche: Novel concepts and emerging therapies. *Leukemia* **2014**, *29*, 259–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Guermouche, H.; Ravalet, N.; Gallay, N.; Deswarte, C.; Foucault, A.; Beaud, J.; Rault, E.; Saindoy, E.; Lachot, S.; Martignoles, J.A.; et al. High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 3550–3557. [\[CrossRef\]](#)

-
69. Oguma, S.; Yoshida, Y.; Uchino, H.; Maekawa, T.; Nomura, T.; Mizoguchi, H. Clinical characteristics of Japanese patients with primary myelodysplastic syndromes: A co-operative study based on 838 cases. *Leuk Res.* **1995**, *19*, 219–225. [[CrossRef](#)]
 70. Matsuda, A.; Germing, U.; Jinnai, I.; Misumi, M.; Kuendgen, A.; Knipp, S.; Aivado, M.; Iwanaga, M.; Miyazaki, Y.; Tsushima, H.; et al. Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2005**, *106*, 2633–2640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Graphical abstract

Supplementary Materials: Low-Dose Pesticides Alter Primary Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells through ALDH2 Inhibition

Amélie Foucault, Noémie Ravalet, Joevin Besombes, Frédéric Picou, Nathalie Gallay, Laetitia Corset, Jérôme Bourgeais, Sophie Hamard, Jorge Domenech, Pascal Loyer, Nicolas Vallet, Julien Lejeune, Emmanuel Gyan, Marie C. Béné, François Vallette, Christophe Olivier and Olivier Hérault

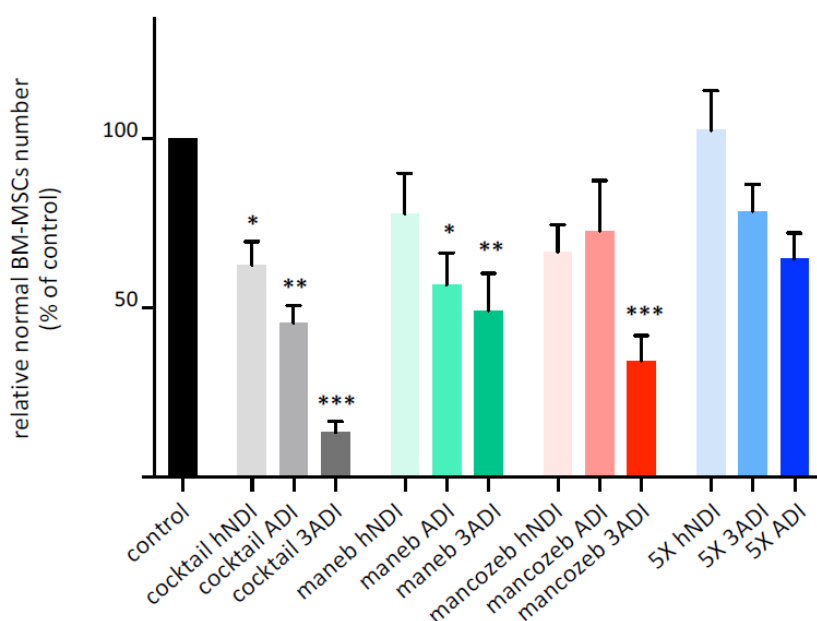


Figure S1. The cocktail effect of pesticides is required to induce a decrease in viable BMMSCs. Maneb alone, mancozeb alone and a mix of 5 other pesticides (iprodione, imazalil, chlorpyrifos ethyl, diazinon, dimethoate – cocktail named “5X”) were used at hNDI, ADI and 3ADI. The effects obtained with the mix of these seven pesticides were recapitulated in neither of these 3 conditions. The number of BM-MSCs was moderately decreased when exposure to maneb, mancozeb or 5 other pesticides (5X hNDI, 5X ADI and 5X 3ADI), a major decrease being observed with high doses (3 ADI) of maneb and mancozeb ($n = 5$).

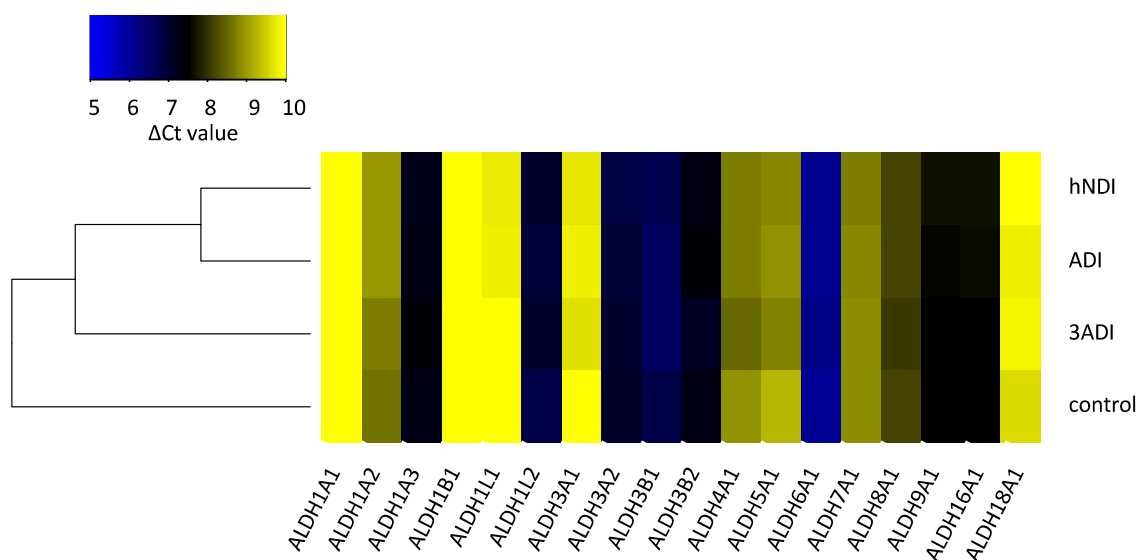


Figure S2. Pesticide cocktail exposure for 21 days does not modify aldehyde dehydrogenase-related genes expression in BM-MSCs. Heatmap showing different detectable isoforms of ALDH family genes (Table S3) in BM-MSCs after 21 days of pesticide exposure in vitro, ($n = 10$).

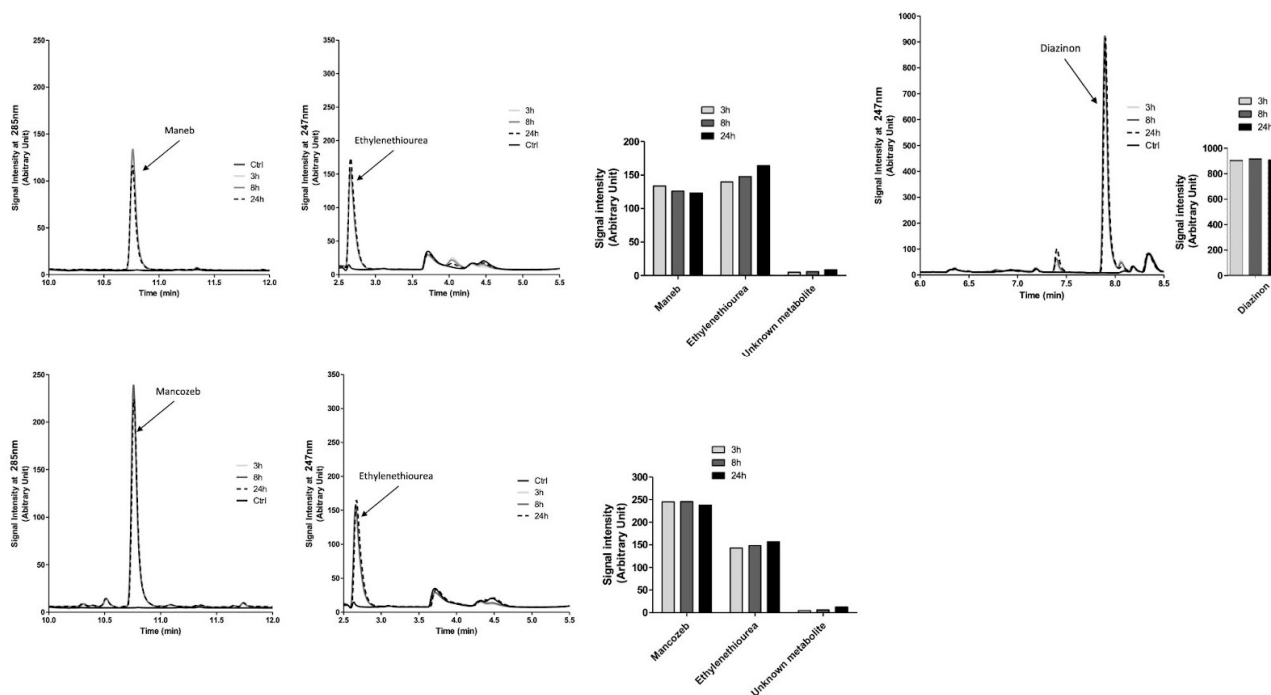


Figure S3. Quantification by HPLC of metabolites of maneb (upper left panel), mancozeb (lower left panel) and diazinon (right panel). BM-MSCs were exposed for 3, 8 and 24 h to 50 μ M pesticide. The quantification of metabolites (ethylenethiourea and unknown compounds for maneb and mancozeb) indicates that the cells are not able to metabolize these pesticides.

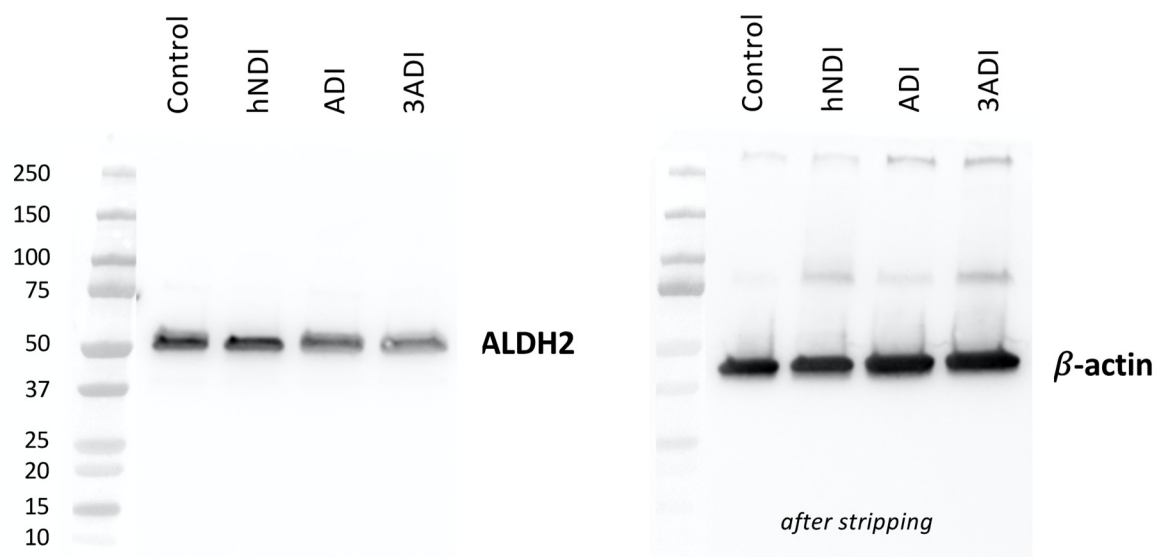


Figure S4. Uncropped western blot images for Figure 3.

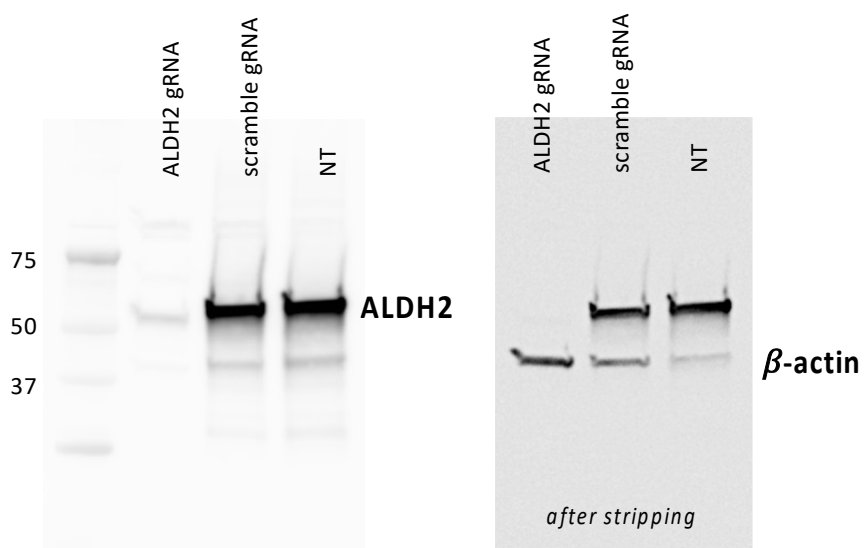


Figure S5. Uncropped western blot images for Figure 4.

Table S1. Characteristics of MDS patients and healthy volunteers.

MDS Patients	Age	Gender	Diagnosis	Cytogenetic	IPSS
MDS 1	72	F	MDS-EB1	46,XX,del(20q11)	0.5
MDS 2	69	M	MDS-MLD	46,XY	0.5
MDS 3	70	M	MDS-RS-SLD	46,XY	0
MDS 4	70	F	MDS-RS-SLD	46,XY	0
MDS 5	83	M	MDS-MLD	46,XY	0.5
MDS 6	70	M	LMMC	46,XY	0.5
MDS 7	69	F	MDS-MLD	46,XY	0
MDS 8	85	M	MDS-RS-SLD	46,XY	0
MDS 9	87	M	MDS-SLD	46,XY	0.5
MDS 10	77	M	MDS-MLD	45,XY, -7, del(5)(q13;q34), add(12)(p11)	1.5
MDS 11	86	F	MDS-MLD	46,XY	0
MDS 12	61	F	MDS-SLD	46,XX, 2 AC	0.5
MDS 13	94	M	LMMC	46,XY	NA
MDS 14	69	M	MDS-MLD	46,XY	0.5
MDS 15	82	F	MDS-SLD	46,XY	0.5
MDS 16	78	M	MDS-EB1	46,XY	2
MDS 17	76	M	MDS-SLD	46,XY	0
MDS 18	71	F	MDS-MLD	46,XY	0.5
Healthy Volunteers	Age Mean (Range)	Male (Number)		Female (Number)	
<i>n</i> = 39	58 (22–101)	21		18	

Table S2. Doses of pesticides.

Heading Title	Final Concentration μM		
	hNDI	ADI	3 ADI
chlorpyrifos ethyl	0.010	0.342	1.027
dimethoate	0.010	0.052	0.157
diazinon	0.003	0.008	0.024
iprodione	0.010	2.181	6.542
imazalil	0.070	1.009	3.028
maneb	0.730	2.262	6.785
mancozeb	0.720	2.251	6.754

Table S3. ALDH family characteristics.

ALDH Family	Subcellular Localisation	Chromosome	Preferred Substrate
ALDH1A1	cytosol	9q21.13	retinal
ALDH1A2	cytosol	15q22.1	retinal
ALDH1A3	cytosol	15q26.2	retinal
ALDH1B1	mitochondria	9q11.1	retinal and acetaldehyde
ALDH1L1	cytosol	3q21.2	10-Formyl tetrahydrofolate
ALDH1L2	unknown	12q23.3	unknown
ALDH2	mitochondria	12q24.2	acetaldehyde, 4-HNE and MDA
ALDH3A1	cytosol, nucleus	17p11.2	aromatic, aliphatic aldehydes
ALDH3A2	microsomes, peroxisomes	17p11.2	fatty aldehydes
ALDH3B1	cytosol	11q13.2	octanal
ALDH3B2	unknown	11q13.2	unknown
ALDH4A1	mitochondria	1p36.13	glutamate γ -semi-aldehyde
ALDH5A1	mitochondria	6p22.2	succinate semi-aldehyde
ALDH6A1	mitochondria	14q24.3	malonate semi-aldehyde
ALDH7A1	cytosol, nucleus, mitochondria	5q31	α -Aminoadipic semi-aldehyde
ALDH8A1	cytosol	6q23.2	retinal
ALDH9A1	cytosol	1q23.2	γ -aminobutyraldehyde
ALDH16A1	unknown	19q13.33	unknown
ALDH18A1	mitochondria	10q24.3	glutamic γ -semi-aldehyde

2) Synthèse

Cette étude a mis en évidence qu'une exposition chronique du microenvironnement médullaire à faibles doses de pesticides altérerait la fonctionnalité des CSM, entraînant une diminution de leur capacité clonogénique. Nous avons également identifié une baisse de l'activité de l'enzyme ALDH2 dans ces cellules exposées aux pesticides. Ces mêmes anomalies ont été retrouvées dans des CSM médullaires de patients avec un SMD, laissant supposer qu'une exposition chronique à des résidus de pesticides pouvait participer à la physiopathologie des SMD.

De manière très intéressante, un polymorphisme génétique bien connu, ALDH2*2 réduit considérablement l'activité de l'enzyme ALDH2. Ce polymorphisme ALDH2*2 est absent chez les Européens, mais est très répandu chez les Asiatiques de l'Est(167). La prévalence du variant ALDH2*2 varie de 28 % (par exemple en Corée) à 45 % (par exemple à Taïwan) dans les populations de ces régions(168) et on estime que 560 millions d'Asiatiques de l'Est sont porteurs de ce polymorphisme(169). L'allèle variant ALDH2*2 est causée par une mutation ponctuelle dans l'exon 12, qui conduit à une substitution d'acide aminé de la glutamine à la lysine (E487K)(170). En raison de la nature tétramérique de l'enzyme ALDH2, la mutation E487K présente un phénotype négatif dominant et affecte à la fois les individus hétérozygotes et homozygotes porteurs de l'allèle variant. Chez les porteurs des génotypes homozygotes ALDH2*2/*2 et hétérozygotes ALDH2*1/*2, l'activité enzymatique est respectivement proche de 0 % et de 17 à 38 % de l'activité normale(171). Ceci entraîne une réduction de la capacité de clairance de l'acétaldéhyde ce qui conduit à une accumulation d'acétaldéhyde en circulation même après une consommation modérée d'alcool(172). Par conséquent, la variante ALDH2*2 provoque le célèbre syndrome asiatique de chasse d'alcool qui se caractérise par des rougeurs du visage, des palpitations, une tachycardie, des nausées et des sensations désagréables lorsque ces personnes consomment de l'alcool(173). Le déficit en ALDH2 est donc l'une des enzymopathies les plus courantes chez l'homme et portées par environ 8% de la population mondiale. L'OR mettant en lien le risque de LAM et de SMD lors d'une exposition professionnelle aux pesticides était d'autant plus significatif dans les populations asiatiques(114,166). On sait que dans 30% des cas, les SMD se transforment en LAM. Une baisse de l'activité ALDH2 pourrait donc participer à la physiopathologie de ces maladies.

III. Impact de l'exposition à faibles doses du manèbe, du mancozèbe sur le microenvironnement médullaire

1) Matériel et méthodes supplémentaires

a) Culture et exposition des cellules

Les CSM primaires médullaires ont été obtenues après mise en culture de cellules médullaires totales prélevées chez des volontaires sains dans le cadre du protocole HEALTHOX (Clinicaltrials.gov n° NCT02789839). Elles ont été cultivées, dans des flacons (Falcon®) de 75 ou de 150 cm², avec une densité d'ensemencement à 1000 cellules/cm², en milieu α -MEM (Life Technologies, Paris, France) avec 10% de SVF, enrichi de 2 mM de L-glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 0,1 mg/mL de streptomycine, 0,025 mg/mL d'amphotéricine B (Bristol-Myers Squibb, Clinton, NY) et de rhFGF2 (1 ng/ml, R&D, Minneapolis, MN) pendant 2 à 4 passages. Ce milieu sera appelé « milieu CSM ».

Les cellules ont été exposées à 4 conditions (contrôle, hNDI appelée aussi %ADI, ADI, 3ADI) du cocktail complet des 7 pesticides (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, éthyle de chlorpyrifos, diazinon et diméthoate), le cocktail des 5 pesticides (iprodione, imazalile, éthyle de chlorpyrifos, diazinon and diméthoate) et le manèbe et le mancozèbe seul.

b) Numération cellulaire

Lorsque la couche de culture a atteint 80 à 90% de confluence, le surnageant a été éliminé, puis après un rinçage par du PBS 1X (Biosolve, Paris, France), une solution de trypsine 0,25% / EDTA 1mM (Lonza, Bâle, Suisse) a été ajoutée et l'ensemble a été incubé à 37°C. Le décollement complet de la couche a été vérifié au microscope inversé en contraste de phases. Du milieu CSM a ensuite été ajouté pour neutraliser la trypsine et laver les cellules. Après centrifugation, les cellules ont été dénombrées en cellule de Malassez après dilution au 1/2 en bleu de Trypan (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Les images de confluence ont été acquises à l'aide d'une caméra (VWR, Radnor, PA) assistée du logiciel IS Visicam Image Analyser® (VWR).

c) Sénescence des cellules

La sénescence des cellules a été suivie par un marquage de l'activité de la β -galactosidase grâce à la trousse du commerce *Cells Histochemical Staining*[®] (Sigma, St. Louis, MO), selon les recommandations du fabricant. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du X-Gal entraînant la formation d'un précipité bleu dans les cellules sénescents. Les cellules positives ont ensuite été comptées par observation au microscope inversé. La densité d'ensemencement était de 2000 cellules/cm², le passage lors du lancement de l'expérience était à P4 ou à P5 et la coloration était lancée au bout de 24h d'incubation à 37°C.

d) ALDH2 qPCR

Les ARN ont été extraits avec la trousse du commerce Maxwell RSC SimplyRNA Tissue[®] (Promega, Madison, WI) et l'automate associé Maxwell[®] 16 (Promega). Un minimum de 10⁶ cellules a été lysé par ajout de 200 μ L de tampon de lyse au culot cellulaire sec, puis les extraits ont été incubés avec de la DNase I et les ARN séparés par sélection magnétique sur colonne. À la suite du protocole automatisé, les ARN ont été dosés par spectrophotométrie sur Nanodrop[®] N-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) et leur qualité a été contrôlée au 2100 Expert Bioanalyseur[®] (Agilent, Santa Clara, CA) avec la puce Eukaryote Total RNA Nano (Agilent). Le ratio des absorbances à 260 nm et 280 nm était supérieur à 1,8 dans tous les cas.

La transcription inverse a été réalisée selon le protocole établi au laboratoire (Superscript[®] VILO cDNA Synthesis kit, Invitrogen, Waltham, MA), dans un volume de 20 μ L (10 μ L d'ARN, 4 μ L de tampon 5X, 4 μ L d'eau DEPC, 2 μ L d'enzyme) à partir de 500 ng d'ARN. Afin de diluer les nucléotides et les sels présents dans la solution, le volume final a été porté à 500 μ L pour une concentration de 1 ng d'équivalent ARN/ μ L.

L'analyse par PCR quantitative a été réalisée grâce au système LightCycler[®] 480 (Roche, Bâle, Suisse), en plaque 384 puits, comme décrit précédemment(174). La moyenne géométrique du Ct des gènes humains ACTB, B2M et GAPDH a été utilisée pour normaliser l'expression d'ALDH2. Les amorces et sondes utilisées sont :

- ALDH2 : (F) cctctatgtggccaacctg, (R) ccaaaccaggcacaatgtt, (sonde) cagcctcc ;
- ACTB : (F) attggcaatgagcgggttc, (R) cgtggatgccacaggact , (sonde) gctggaag ;
- B2M : (F) ttctggcctgcaggctatc, (R) tcagcaaattgactttacattc, (sonde) ccagccgc

- GAPDH : (F) agccacatcgctcagacac, (R) gcccaatacgaccaaattcc, (sonde) ccagccgc

e) Western blot

Les CSM ont été lysées dans 100 µL de tampon de lyse cellulaire NP40 (Invitrogen) contenant des inhibiteurs de protéase et de phosphatase. Des analyses Western-blot ont été réalisées comme décrit précédemment(175) en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'ALDH2 humain dilués au 1/1000 (Proteintech, Rosemount, IL) et un anticorps IgG de chèvre anti-lapin conjugué HRP (Vector laboratoires, Burlingame, CA) au 1/10000. La normalisation a été réalisée grâce à la technologie « *stain-free* », le gel de polyacrylamide contient un composé trihalo exclusif rendant les protéines fluorescentes directement dans le gel permettant la visualisation immédiate des protéines à tout moment pendant l'électrophorèse et lors du transfert sur la membrane. Ceci permet de quantifier la totalité des protéines déposées et de normaliser l'intensité de la bande observée à la quantité totale de protéine déposée. La détection a été réalisée avec le système d'imagerie ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA) et les résultats ont été analysés avec le logiciel Imagelab™ v6.0.1 software (Bio-Rad Laboratories).

f) Mesure du niveau de ROS et des cassures doubles-brins de l'ADN par cytométrie en flux

La détection de ROS a été réalisée par marquage avec la Dichlorofluorescéine diacétate (DCFDA, Invitrogene). Cette molécule est une sonde moléculaire qui permet de détecter les ROS intracellulaires. Les cellules ont été lavées puis marquées avec une concentration finale à 1 µM de DCFDA. Un contrôle non marqué a été fait en parallèle avec du diméthylsulfoxyde (DMSO). Après une incubation à 37°C de 10 minutes, le culot a été lavé avant un passage immédiat sur le cytomètre BD Accuri C6®. L'exploitation des résultats a été réalisée sur le logiciel FlowJo® v10.1 software (Wayne Rasband, NIH, MA).

La quantification du phospho-S139 H2AX a été réalisée par cytométrie en flux avec un anticorps anti-phospho-S139 γH2AX conjugué au FITC (Millipore, Burlington, MA). Les analyses ont été effectuées avec BD Accuri C6® (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). L'exploitation des résultats a été réalisée sur le logiciel FlowJo® v10.1 software (Wayne Rasband).

g) Seahorse

Le métabolisme énergétique a été quantifié à l'aide d'un analyseur Seahorse XFe96 (Agilent Technologies). Après 21 jours d'exposition au manganèse ou aux pesticides, 10^5 cellules viables ont été étalées dans chaque puits. Les mesures du taux de consommation d'oxygène (OCR) et du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) ont été réalisées dans un milieu de base sans substrat (XF Base Medium) additionné de 2 mM de glutamine (Gibco). Les valeurs OCR et ECAR sont présentées en pmol/min/ 10^5 cellules et mpH/min/ 10^5 cellules, respectivement. Des injections séquentielles de glucose (10 mM), d'oligomycine (1 M), de dinitrophénol (DNP) ou de roténone/antimycine A (0,5 M) de Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) ont été utilisées pour déterminer les principaux paramètres métaboliques.

2) Résultats supplémentaires

a) Impact du manèbe et mancozèbe sur les CSM médullaires

Le nombre de CSM vivantes obtenues après une exposition chronique de 21 jours de 5 pesticides (iprodione, imazalile, éthyle de chlorpyrifos, diazinon and diméthoate) ou du manèbe et du mancozèbe seuls ne récapitulent pas les résultats obtenus avec le cocktail complet de 7 pesticides (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, éthyle de chlorpyrifos, diazinon and diméthoate) aux 3 doses d'exposition (Figure 14).

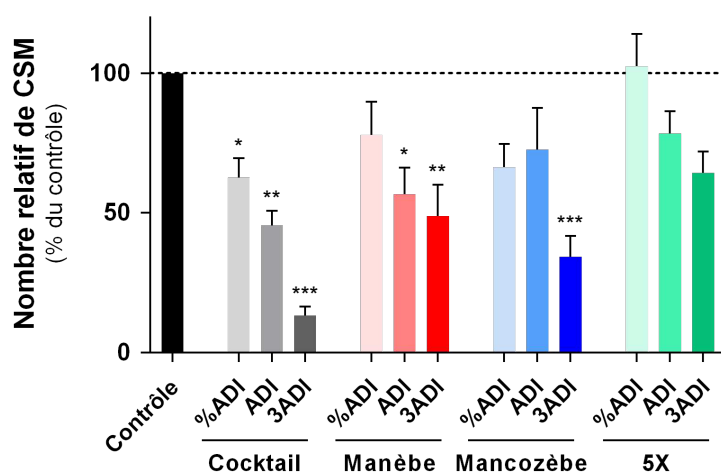


Figure 14 : Effet des pesticides sur la prolifération cellulaire des CSM après une exposition de 21 jours
Le nombre de CSM viables a été quantifié après 21 j d'exposition. Le cocktail complet de 7 pesticides (manèbe, mancozèbe, iprodione, imazalile, chlorpyrifos éthyle, diazinon et diméthoate), le manèbe seul, le mancozèbe seul et un cocktail des 5 autres pesticides (5X : iprodione, imazalile, chlorpyrifos éthyle, diazinon et diméthoate) ont été utilisés. Le nombre de CSM viables est modérément diminué après exposition au manèbe ou au mancozèbe seul sans atteindre l'effet du cocktail complet (n = 5). Les données

sont présentées sous la forme de moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$; test de Friedman suivi d'un test post-hoc de Dunn.

Concernant, la sénescence dans ces CSM exposées aux pesticides, il a été retrouvé une tendance à l'augmentation du pourcentage de cellules sénescents en comparaison au contrôle, et ceci à toutes les conditions. On ne constate pas de différence en fonction du cocktail de 7 ou 5 pesticides (Figure 15).

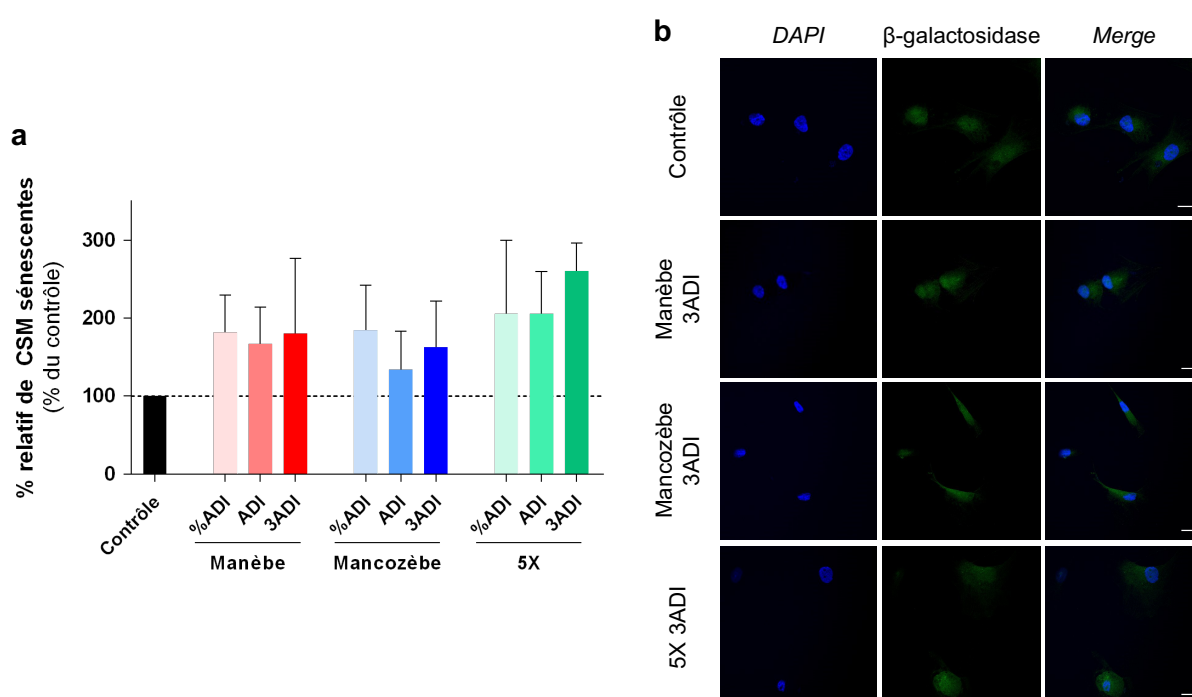


Figure 15 : Effet des pesticides sur la sénescence des CSM après une exposition de 21 jours Le manèbe seul, le mancozèbe seul et le cocktail des 5 autres pesticides (5X) ont été utilisés aux doses %ADI, ADI et 3ADI. (a) L'activité β-galactosidase dans les CSM montre un nombre plus important de cellules positives après l'exposition aux pesticides ($n = 3$) et (b) l'immunofluorescence anti-β-galactosidase confirme ces résultats (barre d'échelle : 20 μ M). Les données sont présentées sous la forme de moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne.

Nous avons par la suite vérifié l'expression du gène *ALDH2* par qPCR puis son expression protéique par western-blot, en fonction de l'exposition au cocktail complet de 7 pesticides, versus le cocktail à 5 pesticides, le manèbe ou le mancozèbe seuls. On constate une tendance à la diminution de l'expression d'*ALDH2* dans toutes les conditions, et plus particulièrement à la condition manèbe seule, aux 3 doses (Figure 16). On retrouve également cette diminution d'expression protéique d'*ALDH2* dans les conditions manèbe et mancozèbe seuls (Figure 16).

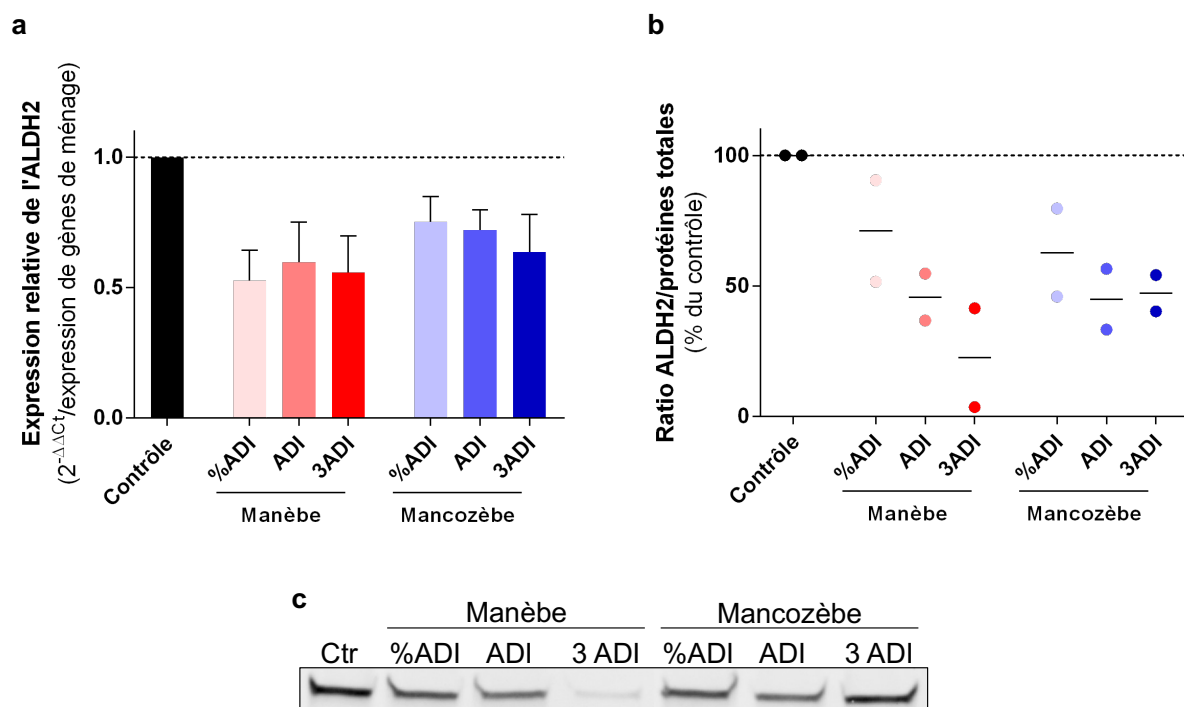


Figure 16 : Effet des pesticides sur ALDH2 après une exposition de 21 jours des CSM

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

PARTIE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'impact des pesticides sur la santé humaine est aujourd'hui une réelle question de santé publique. De plus en plus d'hémopathies sont notamment reconnues comme des maladies professionnelles chez les utilisateurs de ces produits phytosanitaires à de fortes doses. Cependant, à ce jour seulement 3 pathologies sont inscrites au journal officiel et reconnues comme maladies professionnelles : le LNH, la LLC et le myélome. Le lien entre l'exposition à fortes doses de pesticides et le risque d'hémopathies myéloïdes est lui plus controversé même si les études sont aujourd'hui plutôt en faveur d'une association significative(114,166).

Notre méta-analyse ciblée sur les études cas-témoins évaluant l'association entre l'exposition professionnelle aux pesticides et le risque de leucémie aiguë myéloïde chez l'adulte, basée sur une stratégie de recherche par mots clés a été réalisée à partir des bases MEDLINE, EMBASE et Cochrane. Les critères d'inclusion des études étaient : (i) type cas-témoins, (ii) avec des cas non limités à une seule profession, (iii) décrivant spécifiquement les leucémies aiguës myéloïdes, (iv) et les sujets contrôles devaient être sans antécédent de cancer. Cette stratégie a permis d'identifier 6.784 publications, 14 publications ont été retenues pour cette méta-analyse. Ainsi, 3.955 patients présentant une leucémie aiguë myéloïde et 9.948 sujets témoins ont été inclus dans cette étude. Afin d'identifier les potentiels biais dans l'interprétation finale de l'OR, une analyse minutieuse de la conception de chaque étude a été réalisée. Les principaux biais étaient liés à la définition du terme « pesticide » et à l'évaluation de l'exposition. Par ailleurs, l'identification des sous-groupes de leucémie aiguë myéloïde selon la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) n'était rapportée que dans 2 études. L'analyse globale a ainsi montré une association défavorable significative entre l'exposition professionnelle aux pesticides et la survenue d'une leucémie aiguë myéloïde (OR = 1,51; IC 95 % : 1,10-2,08). Cet OR n'était pas modifié par une analyse de sensibilité, et lors de l'inclusion progressive des études retenues, il devenait significatif à partir des publications de 2010, correspondant à l'inclusion de 2.689 patients au total. Après correction du biais de publication observé sur un funnel plot, l'OR était au maximum de 1,83 (IC 95 % : 1,32-2,53). Une analyse stratifiée a mis en évidence que l'OR était plus élevé dans : (i) la population asiatique (OR = 1,74; IC 95 % : 1,32-2,30); (ii) les études rapportant les expositions à des insecticides (OR = 1,47; IC 95 % : 1,15-1,88); (iii) les études avec un score de qualité NOS élevé (OR = 1,64; IC 95 % : 1,15-2,33) ou avec peu de risque de biais (OR = 1,79; IC 95 % : 1,07-2,97). Cette étude a donc identifié une association défavorable

entre l'exposition professionnelle aux pesticides et les leucémies aiguës myéloïdes. Cependant, elle ne permet pas d'établir un lien causal entre les deux variables. En effet, les études incluses dans la méta-analyse ont rapporté un OR avec des facteurs de confusion incontrôlés entre les témoins et les patients atteints de LAM, car les caractéristiques de la LAM et les facteurs de risque sont souvent mal rapportés dans les études. De même, les relations dose-réponses sont des informations essentielles pour discuter de la causalité, or les doses d'exposition n'ont été rapportées que dans trois références(123,176,177). Parmi celles-ci, on a observé un risque plus élevé de LAM dans le groupe hautement exposé(123). Dans l'analyse stratifiée, l'OR était plus élevé dans la population d'Amérique du Nord et d'Asie ainsi que dans les périodes d'inclusion après 1995. Ce résultat peut également soutenir un effet de relation de dose étant donné que l'utilisation de pesticides est plus élevée dans ces populations. Très peu d'études ont précisé le type d'exposition (classe de pesticide) et les notions de relation dose-effet. Ainsi, des études biologiques *in vitro* ultérieures seront nécessaires pour identifier les mécanismes cellulaires par lesquels les pesticides seuls ou en association (effet cocktail) augmentent le risque de développer une leucémie aiguë myéloïde.

Alors que ce risque de LAM, chez les sujets exposés professionnellement aux pesticides, était jusque-là peu décrit, le risque de lymphome est quant à lui bien connu depuis déjà les années 90. Alavanja *et al.* ont d'ailleurs rapporté un risque très augmenté de LNH lié à l'exposition professionnelle aux pesticides (OR = 4,2 ; IC 95 % : 1,2-14). Plus récemment, une étude cas-témoins basée sur la population australienne, initiée dans les années 2000 a montré qu'une exposition à tout pesticide était associée à un triplement du risque de lymphome non hodgkinien (OR = 3,09 ; IC 95 % : 1,42-6,70)(89). Certaines études s'intéressent également à la relation entre l'utilisation de certaines classes de pesticides et le risque d'hémopathies, notamment lymphoïdes(94).

Ces premiers résultats renforcent la nécessité de réflexions sociétales sur l'utilisation de façon raisonnée de ces produits phytosanitaires. Ils permettront de donner des pistes de réflexion sur des aspects législatifs et réglementaires notamment en termes de distance nécessaire entre les habitations et les zones d'épandage.

Nous avons par la suite, étudié l'impact *in vitro* d'une exposition à de très faibles doses de pesticides sur le microenvironnement médullaire et ce de façon cumulative. Des CSM médullaires primaires ont ainsi été exposées, pendant 21 jours, à un cocktail de 7 pesticides,

les plus souvent rapportés dans les rapports de l'EFSA(146–148) et ceci à de très faibles doses. Nous avons ainsi mis en évidence une dérégulation du gène *ALDH2* après avec une relation dose réponse. Cette baisse d'activité et d'expression de l'enzyme ALDH2 s'accompagnait d'une accumulation d'acétaldéhyde dans la cellule, associée à une augmentation de la sénescence et à des cassures doubles-brins de l'ADN. Une altération fonctionnelle des CSM exposées aux pesticides a également été mise en évidence, caractérisée par un défaut de soutien de l'hématopoïèse, avec une diminution de près de 50% de leur capacité de clonogénique. Ces mêmes anomalies ont également été retrouvées dans les CSM de patients avec un SMD. Sachant que l'incidence des SMD est plus élevée chez les personnes âgées, ils surviennent chez une population qui a été exposée tout au long de sa vie à des résidus de pesticides. De plus, les sujets âgés de plus de 50 ans présentent fréquemment une hématopoïèse clonale (10 à 40 % selon les études) qui est associée à un risque accru de SMD et de LAM(178,179). Cependant, seuls certains patients développeront effectivement une hémopathie maligne et les facteurs favorisant cette évolution vers une de ces pathologies restent à ce jour largement méconnus. Dans ce contexte, l'imprégnation chronique du microenvironnement médullaire par de faibles doses de pesticides pourrait favoriser le développement des hémopathies myéloïdes et notamment participer à la physiopathologie des SMD. L'enjeu majeur des futures recherches sera donc d'identifier les anomalies moléculaires afin de pouvoir proposer des pistes de préventions.

Concomitamment, il convient de préciser que l'âge médian au moment du diagnostic des SMD chez les patients japonais est de 57 ans, significativement plus jeune que dans les pays occidentaux (71 ans)(180,181). Cette observation, combinée au fait que 35 à 45% des personnes d'Asie de l'Est présentent une déficience héréditaire de l'activité ALDH2(182), renforce l'implication possible de la sous-expression d'*ALDH2* induite par les pesticides dans la physiopathologie des SMD. Enfin, ces hémopathies sont bien connues pour être des maladies pré-leucémiques et lorsque l'on considère le risque de LAM après une exposition professionnelle aux pesticides, nous avons rapporté, de manière intéressante, que l'OR était plus élevé dans la population asiatique(166).

Le rôle crucial de l'*ALDH2* dans l'hématopoïèse a également été rapporté dans plusieurs études(183,184). En utilisant un modèle de souris d'anémie de Fanconi dépourvu de *FANCD2* et d'*ALDH2* il a été observé que le développement de leucémie aiguë et d'aplasie médullaire étaient plus précoce que dans les modèles non mutés. Dans ce modèle, l'accumulation

d'aldéhydes endogènes dans la cellule pourrait donc être la source des dommages à l'ADN et pourrait être responsable des anomalies observées. Chez l'homme, il existe un polymorphisme *ALDH2* fonctionnel (*ALDH2*; rs671, Glu504Lys), entraînant une baisse de l'activité d'*ALDH2*, qui est très répandu dans les populations d'Asie de l'Est(182,185,186). Dans ces populations, le polymorphisme *ALDH2* est lié à une progression accélérée de l'aplasie médullaire et de transformation en leucémie chez les patients atteints d'anémie de Fanconi(187,188). De plus, ce polymorphisme affectant le métabolisme des aldéhydes endogènes, entraînerait une augmentation significative de la mortalité liée à la greffe de moelle osseuse(189).

Une relation intéressante a été établie entre l'*ALDH* et la toxicité des pesticides, plus particulièrement avec le mancozèbe et le manèbe, deux pesticides appartenant à la famille des dithiocarbamates. Cette toxicité a été principalement décrite dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer(190,191). De plus, ces deux pesticides présents dans le cocktail ont été largement retrouvés dans l'environnement selon les rapports de l'EFSA(146–148). Dans son dernier rapport, l'EFSA a publié que 19,2 % de tous les échantillons alimentaires analysés étaient positifs pour les DTC avec des pourcentages particulièrement élevés dans les poires (35,5%), les oranges, les haricots, les carottes et les kiwis. L'EFSA a d'ailleurs classé le mancozèbe comme toxique pour la reproduction de catégorie 1B et comme perturbateur endocrinien. Alors que le manèbe était interdit dans l'UE (2017/2018), le renouvellement du mancozèbe initialement prévu en avril 2020 a été suspendu. Dans sa «saisine 2018-SA-0163», l'ANSES recommandait à la Commission européenne d'envisager dans les plus brefs délais le non-renouvellement de l'approbation du mancozèbe compte tenu des risques identifiés pour la santé humaine et du niveau élevé d'exposition résultant d'une utilisation intensive. L'Union Européenne a donc adopté le non-renouvellement du mancozèbe, qui devrait être retiré du marché européen, en 2021, bien que la plupart des pays aient maintenu l'autorisation au niveau national au moins jusqu'en 2022. Malgré le fait que la plupart des DTC seront bientôt interdits dans l'UE, ces pesticides resteront présents dans les aliments importés. Nous nous sommes donc également intéressé à la toxicité de ces deux molécules appartenant à la famille des DTC. On a ainsi étudié l'impact des 3 faibles doses de pesticide (hNDI, ADI, 3ADI) du manèbe et du mancozèbe seul sur les CSM médullaires primaires. On a comparé les résultats de numération, de sénescence et d'expression d'*ALDH2* de ces deux pesticides seuls aux résultats obtenus avec le cocktail des 5 autres pesticides et

avec le cocktail complet des 7 pesticides. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de l'effet cocktail puisque les conséquences sont plus importantes avec le cocktail complet qu'avec le cocktail de 5 pesticides ou le manèbe/mancozèbe seul (en particulier sur l'impact de la prolifération). On a également reproduit les résultats de la baisse d'expression d'*ALDH2* avec une implication du manèbe qui semble majeure.

Le catabolisme du manèbe et du mancozèbe entraîne la libération de manganèse (Mn) qui peut également jouer un rôle dans la toxicité et les altérations métaboliques lors de l'exposition des CSM à ces 2 pesticides. Le Mn est essentiel à une bonne hématopoïèse(192). La déplétion de la superoxyde dismutase du Mn dans les cellules souches hématopoïétiques murines perturberait l'homéostasie du fer et du Mn, la commutation des globines et le contrôle épigénétique des érythroblastes(193). Dans la population générale, les principales sources d'exposition au Mn sont les aliments et l'eau potable. L'apport quotidien moyen dans l'ensemble de la population européenne est de 2 à 3 mg(194) et l'ANSES a adopté la recommandation de 2,8 et 2,5 mg/jour respectivement pour les hommes et les femmes (Saisine n ° 2016-SA- 0203)(195). Les aliments les plus riches en Mn comprennent le riz et les noix, mais on le trouve également dans les fruits de mer, le chocolat, le thé, les légumes verts à feuilles, les épices, le soja et certains fruits comme l'ananas et les myrtilles. L'ensemble de ces résultats soutiennent fortement que l'exposition aux fongicides contenant du Mn peut exercer de multiples fonctions délétères. Nous avons donc pour objectif, dans un prochain projet, d'étudier les impacts d'une exposition chronique au Mn sur des CSM médullaires primaires. Les résultats préliminaires montrent un défaut prolifératif majeur associé à des anomalies fonctionnelles, avec une diminution de leur capacité clonogénique.

Lors de cette exposition chronique à de faibles doses de pesticides, nous avons montré des altérations majeures du microenvironnement médullaire, notamment avec une baisse de leur capacité de soutien de l'hématopoïèse. Cette altération laisse ainsi présager une répercussion sur l'hématopoïèse normale et leucémique. Il sera donc nécessaire d'étudier l'impact de l'exposition chronique aux pesticides sur la niche normale et leucémique, en réalisant des co-cultures entre ces CSM pré-exposées aux pesticides et respectivement des CD34⁺ normales, ou des cellules leucémiques.

Une des limites de cette étude concerne les concentrations en pesticides mises en contact avec les CSM. Ce travail permet d'avoir une approche sur la relation dose-effet. Cependant, celles-ci ne correspondent probablement pas exactement aux quantités réelles retrouvées au

sein de la niche hématopoïétique de façon physiologique lors d'une exposition à des résidus de pesticides. De plus, ce modèle *in vitro* ne tient pas compte des mécanismes de métabolisation des composés chimiques étudiés. Pour se rapprocher des conditions physiologiques, il faudrait envisager une quantification de l'imprégnation réelle des individus avec par exemple des dosages toxicologiques des résidus de pesticides retrouvés au niveau sanguin, voir même dans des plasmas de moelles osseuses. Dans ce but, nous avons pour objectif de doser la quantité résiduelle de pesticides retrouvée au niveau plasmatique chez des sujets sains, afin d'établir les concentrations moyennes de pesticides résiduels retrouvés dans la population générale. Ces résultats seront comparés à la quantité résiduelle retrouvée chez des patients développant un SMD ou une LAM après une exposition professionnelle aux pesticides. Ces dosages sont cependant difficiles à réaliser en raison de leur demi vie parfois courte et de leur métabolisation. Il sera également intéressant de générer une banque de CSM issues de patients exposés à de fortes doses de pesticides et qui développent un SMD ou une LAM. Ceci nous donnerait accès à des échantillons primaires et nous permettrait de caractériser les anomalies biologiques du microenvironnement de ces patients.

Pour conclure, l'exposition de la population générale est certaine, et même si les effets sont encore aujourd'hui peu connus, il semble essentiel de trouver des alternatives pour réduire l'exposition de la population générale. La prévention primaire consisterait à réduire l'usage des pesticides en limitant l'usage des phytosanitaires au strict nécessaire, en optimisant les doses et la fréquence des traitements, tout en garantissant des rendements suffisants. La prévention secondaire consisterait à prévenir les effets de ces résidus de pesticides sur la population générale.

Des études récentes comparant les résidus de pesticides dans les aliments biologiques et conventionnels concluent que la consommation d'aliments issus de l'agriculture biologique est une approche qui réduit considérablement l'exposition aux pesticides(196,197). Il semblerait ainsi que la consommation d'aliments issus de l'agriculture biologique pourrait également réduire le risque le LNH(198,199). On pourrait également proposer des inducteurs d'ALDH2 pour restaurer son activité, impactée lors de l'exposition chronique à de faibles doses de pesticides. En 2008, Chen *et al.* ont décrit qu'une petite molécule organique appelée ALDA-1 (N-(1,3-benzodioxol-5-ylméthyl)-2,6-dichlorobenzamide), qui, à des faibles concentrations,

agit comme un activateur pharmacologique de l'ALDH2, doublant son activité catalytique(200). Des études animales ont montré que l'administration d'ALDA-1 exerce notamment une neuroprotection dans des modèles d'ischémie/reperfusion(201). La capacité d'Alda-1 à compléter ou à restaurer partiellement l'activité d'ALDH2*2 mutante est à noter car il est rare de trouver une petite molécule qui puisse spécifiquement restaurer une mutation chez l'homme(200). Plus récemment, grâce à un modèle de souris, les effets protecteurs de l'activation de l'enzyme ALDH2 par l'Alda-1 ont été mis en évidence, permettant de réduire le niveau de dommages à l'ADN au niveau œsophagien, chez des personnes atteintes du polymorphisme *ALDH2*(202). Cette nouvelle thérapeutique pourrait ainsi prévenir la carcinogenèse induite par l'acétaldéhyde chez ces patients. Trois nouvelles classes de composés ont également été modifiées à partir d'Alda-1 pour améliorer leur solubilité dans l'eau et leurs propriétés médicamenteuses(203). Ces composés sont cependant d'origine chimique et il serait préférable de trouver des composés de type « alicaments » capable de restaurer l'activité ALDH2 tout en ayant une origine naturelle, et qui pourrait ainsi être pris en préventif, au long court.

Concernant la prévention des professionnels exposés à de fortes doses de pesticides, elle repose sur une formation théorique des risques liés à l'utilisation de ces substances ainsi qu'une formation théorique et pratique du bon usage des équipements de protection individuelle (gants, masques).

Ces résultats majeurs s'inscrivent dans la thématique de recherche sur les conséquences biologiques des facteurs environnementaux sur la niche hématopoïétique (méthylation de l'ADN, métabolisme énergétique, cycle cellulaire, chimiorésistance...). Celle-ci est en plein devenir au sein de l'équipe LNOx, et constitue l'axe du projet de recherche que je souhaite développer dans la suite de ma thèse d'université.

Bibliographie

1. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
2. Pietras EM, Reynaud D, Kang Y-A, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, et al. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell*. 2015;17(1):35-46.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
4. Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011;29(12):1117-1119.
5. Pina C, Fugazza C, Tipping AJ, Brown J, Soneji S, Teles J, et al. Inferring rules of lineage commitment in haematopoiesis. *Nat Cell Biol*. 2012;14(3):287-294.
6. Macaulay IC, Svensson V, Labalette C, Ferreira L, Hamey F, Voet T, et al. Single-cell RNA-sequencing reveals a continuous spectrum of differentiation in hematopoietic cells. *Cell Rep*. 2016;14(4):966-977.
7. Tusi BK, Wolock SL, Weinreb C, Hwang Y, Hidalgo D, Zilionis R, et al. Population snapshots predict early haematopoietic and erythroid hierarchies. *Nature*. 2018;555(7694):54-60.
8. Nestorowa S, Hamey FK, Pijuan Sala B, Diamanti E, Shepherd M, Laurenti E, et al. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood*. 2016;128(8):e20-31.
9. Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol*. 2017;19(4):271-281.
10. Haas S, Trumpp A, Milsom MD. Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Cell Stem Cell*. 2018;22(5):627-638.
11. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif*. 1970;3(4):393-403.
12. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4(5):267-74.
13. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 1991;9(5):641-650.
14. Hoggatt J, Pelus LM. Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(2):13.
15. Taichman RS. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1994;179(5):1677-1682.
16. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*. 1996;19(5):421-428.
17. Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity TL. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem*. 1989;264(30):17931-17938.
18. Shimoza T, Kincade PW. Prostaglandin E2 and stem cell factor can deliver opposing signals to B lymphocyte precursors. *Cell Immunol*. 1999;29(1):21-29.
19. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Fahey F, Daley GQ. Bone marrow adipocytes as negative regulators of the hematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-263.
20. Rafii S, Shapiro F, Pettengell R, Ferris B, Nachman RL, Moore MA, et al. Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood*. 1995;86(9):3353-3363.
21. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241(4861):58-62.
22. Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*. 2008;111(2):492-503.

23. Miyamoto T. Role of osteoclasts in regulating hematopoietic stem and progenitor cells. *World J Orthop.* 2013;4(4):198-206.
24. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(5):303-320.
25. Foudi A, Zhang Y, Liang H, Wittner M, Louache F. Environnement de la moelle osseuse et domiciliation des cellules souches hématopoïétiques. *EMC-Hématologie.* 2019;14:1-11.
26. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leukemia Research.* 2005;29(2):215-224.
27. Poloni A, Maurizi G, Mattiucci D, Amatori S, Fogliardi B, Costantini B, et al. Overexpression of CDKN2B (p15INK4B) and altered global DNA methylation status in mesenchymal stem cells of high-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2014;28(11):2241-2244.
28. Aanei CM, Flandrin P, Zugun Eloae F, Carasevici E, Guyotat D, Wattel E, et al. Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes. *Stem Cells Dev.* 2012;21(10):1604-1615.
29. Blau O, Hofmann W-K, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schümann E, et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol.* 2007;35(2):221-229.
30. Geyh S, Oz S, Cadeddu R-P, Fröbel J, Brückner B, Kündgen A, et al. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia.* 2013;27(9):1841-1851.
31. Poon Z, Dighe N, Venkatesan SS, Cheung AMS, Fan X, Bari S, et al. Bone marrow MSCs in MDS: contribution towards dysfunctional hematopoiesis and potential targets for disease response to hypomethylating therapy. *Leukemia.* 2019;33(6):1487-1500.
32. Medyouf H, Mossner M, Jann J-C, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell.* 2014;14(6):824-837.
33. Abbas S, Kumar S, Srivastava VM, Therese M M, Nair SC, Abraham A, et al. Heterogeneity of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndrome-with multilineage dysplasia (MDS-MLD). *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2019;35(2):223-232.
34. Varga G, Kiss J, Várkonyi J, Vas V, Farkas P, Pálóczi K, et al. Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(4):311-319.
35. Kim EM, Jung C-H, Kim J, Hwang S-G, Park JK, Um H-D. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting Bcl-2 family proteins. *Cancer Res.* 2017;77(11):3092-3100.
36. Falconi G, Fabiani E, Fianchi L, Criscuolo M, Raffaelli CS, Bellesi S, et al. Impairment of PI3K/AKT and WNT/ β -catenin pathways in bone marrow mesenchymal stem cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol.* 2016;44(1):75-83.e1-4.
37. Pavlaki K, Pontikoglou CG, Demetriadou A, Batsali AK, Damianaki A, Simantirakis E, et al. Impaired proliferative potential of bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndromes is associated with abnormal WNT signaling pathway. *Stem Cells Dev.* 2014;23(14):1568-1581.
38. Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJG, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal inflammation drives genotoxic stress in hematopoietic stem cells and predicts disease evolution in human pre-leukemia. *Cell Stem Cell.* 2016;19(5):613-627.
39. Chen S, Zambetti NA, Bindels EMJ, Kenswil K, Mylona AM, Adisty NM, et al. Massive parallel RNA sequencing of highly purified mesenchymal elements in low-risk MDS reveals tissue-context-dependent activation of inflammatory programs. *Leukemia.* 2016;30(9):1938-1942.
40. Ping Z, Chen S, Hermans SJF, Kenswil KJG, Feyen J, van Dijk C, et al. Activation of NF- κ B driven inflammatory programs in mesenchymal elements attenuates hematopoiesis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2019;33(2):536-541.

41. Fei C, Zhao Y, Guo J, Gu S, Li X, Chang C. Senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells is accompanied by activation of p53/p21 pathway in myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 2014;93(6):476-486.
42. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(12):4473-4475.
43. Yang A, Lu Y, Xing J, Li Z, Yin X, Dou C, et al. IL-8 enhances therapeutic effects of BMSCs on bone regeneration via CXCR2-Mediated PI3k/Akt signaling pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(1):361-370.
44. Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature.* 2010;464(7290):852-857.
45. Zhao Y, Wu D, Fei C, Guo J, Gu S, Zhu Y, et al. Down-regulation of Dicer1 promotes cellular senescence and decreases the differentiation and stem cell-supporting capacities of mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 2015;100(2):194-204.
46. Ozdogan H, Gur Dedeoglu B, Oztemur Islakoglu Y, Aydos A, Kose S, Atalay A, et al. DICER1 gene and miRNA dysregulation in mesenchymal stem cells of patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Leuk Res.* 2017;63:62-71.
47. Santamaría C, Muntión S, Rosón B, Blanco B, López-Villar O, Carrancio S, et al. Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. *Haematologica.* 2012;97(8):1218-1224.
48. Hamidouche Z, Fromigué O, Ringe J, Häupl T, Marie PJ. Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation. *BMC Cell Biol.* 2010;11:44.
49. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *J Clin Invest.* 2014;124(2):466-472.
50. Geyh S, Rodríguez-Paredes M, Jäger P, Koch A, Bormann F, Gutekunst J, et al. Transforming growth factor β 1-mediated functional inhibition of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2018;103(9):1462-1471.
51. Zheng Q, Zhao Y, Guo J, Zhao S, Fei C, Xiao C, et al. Iron overload promotes mitochondrial fragmentation in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients through activation of the AMPK/MFF/Drp1 pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):515.
52. Hu J, Meng F, Hu X, Huang L, Liu H, Liu Z, et al. Iron overload regulate the cytokine of mesenchymal stromal cells through ROS/HIF-1 α pathway in Myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2020;93:106354.
53. Sarhan D, Wang J, Sunil Arvindam U, Hallstrom C, Verneris MR, Grzywacz B, et al. Mesenchymal stromal cells shape the MDS microenvironment by inducing suppressive monocytes that dampen NK cell function. *JCI Insight.* 2020;5(5):130155.
54. Boada M, Echarte L, Guillermo C, Diaz L, Touriño C, Grille S. 5-Azacytidine restores interleukin 6-increased production in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic patients. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2021;43(1):35-42.
55. Santos GC, Silva DN, Fortuna V, Silveira BM, Orge ID, de Santana TA, et al. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) overexpression increases the angiogenic potential of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:778.
56. Bulychева E, Rauner M, Medyouf H, Theurl I, Bornhäuser M, Hofbauer L, et al. Myelodysplasia is in the niche: novel concepts and emerging therapies. *Leukemia.* 2014;29(2):259-268.
57. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Gutiérrez-Espíndola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, et al. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia Research.* 2008;32(9):1407-1416.
58. Chen Q, Yuan Y, Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Mol Med Rep.* 2014;9(1):293-298.

59. Chandran P, Le Y, Li Y, Sabloff M, Mehic J, Rosu-Myles M, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. *Leuk Res.* 2015;39(4):486-493.
60. Kim J-A, Shim J-S, Lee G-Y, Yim HW, Kim T-M, Kim M, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2015;75(11):2222-2231.
61. Christ O, Lucke K, Imren S, Leung K, Hamilton M, Eaves A, et al. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematologica.* 2007;92(9):1165-1172.
62. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(31):11707-11712.
63. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(12):4234-4241.
64. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555-567.
65. WenJun Zhang FJ, JianFeng Ou. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci.* 2011;1(2):125-144.
66. Clark WH. Environmental pollutants and the epidemiology of cancer. *Environ Health Perspect.* 1978;27:7-10.
67. Durham WF, Williams CH. Mutagenic, teratogenic, and carcinogenic properties of pesticides. *Ann Rev Entomol.* 1972;17:123-148.
68. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. In Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 1987. p. 80-3.
69. Blair A, Zahm SH. Agricultural exposures and cancer. *Environ Health Perspect.* 1995;103(Suppl. 8):205-208.
70. Blair A, Zahm SH, Pearce NE, Heineman EF, Fraumeni JF. Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scand J Work Environ Health.* 1992;18(4):209-215.
71. Weichenthal S, Moase C, Chan P. A Review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study Cohort. *Environ Health Perspect.* 2010;118(8):1117-1125.
72. Provost D, Cantagrel A, Lebailly P, Jaffre A, Loiseau H, Vital A, et al. Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occup Environ Med.* 2007;64:509-514.
73. Samanic CM, Roos A De, De Roos AJ, Stewart PA, Rajaraman P, Waters MA, et al. Occupational exposure to pesticides and risk of adult brain tumors. *Am J Epidemiol.* 2008;167(8):976-985.
74. Luqman M, Javed MM, Daud S, Raheem N, Ahmad J, Khan A-U-H. Risk factors for lung cancer in the Pakistani population. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 2014;15(7):3035-3039.
75. Lerro C, Lubin J, Ma X, Zhang Y, Freeman LEB. Use of acetochlor and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer.* 2016;137(5):1167-1175.
76. INSERM. Pesticides classés par le CIRC. In: Pesticides effets sur la santé. 2013. p. Annexe 4.
77. Ventura C, Venturino A, Miret N, Randi A, Rivera E, Núñez M, et al. Chlorpyrifos inhibits cell proliferation through ERK1/2 phosphorylation in breast cancer cell lines. *Chemosphere.* 2015;120:343-350.
78. Blair A, Malke H, Cantor KP, Burmeister L, Wiklund K. Cancer among farmers. A review. *Scand J Work Environ Health.* 1985;11(6):397-407.
79. Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastre L. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control.* 2007;18(10):1209-1226.

80. Van Maele-Fabry G, Duhayon S, Lison D. A systematic review of myeloid leukemias and occupational pesticide exposure. *Cancer Causes Control*. 2007;18(5):457-478.
81. Inserm. Synthèse de l'expertise collective Pesticides et santé – Nouvelles données. 2021.
82. Khuder SA, Mutgi AB. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med*. 1997;32(5):510-516.
83. Acquavella J, Olsen G, Cole P, Ireland B, Kaneene J, Schuman S, et al. Cancer among farmers: a meta-analysis. *Ann Epidemiol*. 1998;8(1):64-74.
84. Perrotta C, Staines A, Cocco P. Multiple myeloma and farming. A systematic review of 30 years of research. Where next? *J Occup Med Toxicol*. 2008;3(1):27.
85. Jones DR, Sutton a J, Abrams KR, Fenty J, Warren F, Rushton L. Systematic review and meta-analysis of mortality in crop protection product manufacturing workers. *Occup Environ Med*. 2009;66(1):7-15.
86. Presutti R, Harris SA, Kachuri L, Spinelli JJ, Pahwa M, Blair A, et al. Pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in men: an analysis of the North American Pooled Project. *Int J Cancer*. 2016;139(8):1703-1714.
87. Tual S, Busson A, Boulanger M, Renier M, Piel C, Pouchieu C, et al. Occupational exposure to pesticides and multiple myeloma in the AGRICAN cohort. *Cancer Causes Control*. 2019;30(11):1243-1250.
88. Journal officiel de la République française - Décrets, arrêtés, circulaires. Décret No 2019-312.
89. Fritschi L. Occupational exposure to pesticides and risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2005;162(9):849-857.
90. Eriksson M, Hardell L, Carlberg M, Åkerman M. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *Int J Cancer*. 2008;123(7):1657-1663.
91. Zheng T, Zahm SH, Cantor KP, Weisenburger DD, Zhang Y, Blair A. Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma. *J Occup Environ Med*. 2001;43(7):641-649.
92. Lynch SM, Mahajan R, Beane Freeman LE, Hoppin JA, Alavanja MCR. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to butylate in the Agricultural Health Study (AHS). *Environ Res*. 2009;109(7):860-868.
93. McDuffie HH, Pahwa P, McLaughlin JR, Spinelli JJ, Fincham S, Dosman JA, et al. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2001;10(11):1155-1163.
94. Leon ME, Schinasi LH, Lebailly P, Beane Freeman LE, Nordby K-C, Ferro G, et al. Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *Int J Epidemiol*. 2019;48(5):1519-1535.
95. Beane Freeman LE, Bonner MR, Blair A, Hoppin JA, Sandler DP, Lubin JH, et al. Cancer incidence among male pesticide applicators in the agricultural health study cohort exposed to diazinon. *Am J Epidemiol*. 2005;162(11):1070-1079.
96. Purdue MP, Hoppin JA, Blair A, Dosemeci M, Alavanja MCR. Occupational exposure to organochlorine insecticides and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Int J Cancer*. 2007;120(3):642-649.
97. Schinasi LH, De Roos AJ, Ray RM, Edlefsen KL, Parks CG, Howard B V., et al. Insecticide exposure and farm history in relation to risk of lymphomas and leukemias in the Women's Health Initiative observational study cohort. *Ann Epidemiol*. 1 nov 2015;25(11):803-810.e4.
98. Journal officiel de la République française - Décrets, arrêtés, circulaires. Décret No 2015-636.
99. Navaranjan G, Hohenadel K, Blair A, Demers PA, Spinelli JJ, Pahwa P, et al. Exposures to multiple pesticides and the risk of Hodgkin lymphoma in Canadian men. *Cancer Causes Control*. 2013;24(9):1661-1673.
100. Latifovic L, Freeman LEB, Spinelli JJ, Pahwa M, Kachuri L, Blair A, et al. Pesticide use and risk of Hodgkin lymphoma: results from the North American Pooled Project (NAPP). *Cancer Causes Control*. 2020;31(6):583-599.

101. Ciccone G, Mirabelli D, Levis A, Gavarotti P, Rege-Cambrin G, Davico L, et al. Myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes: chemical exposure, histologic subtype and cytogenetics in a case-control study. *Cancer Genet Cytogenet.* juill 1993;68(2):135-139.
102. Blair A, White DW. Death certificate study of leukemia among farmers from Wisconsin. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1981;66(6):1027-1030.
103. Brownson RC, Reif JS. A cancer registry-based study of occupational risk for lymphoma, multiple myeloma and leukaemia. *Int J Epidemiol.* mars 1988;17(1):27-32.
104. Blair A, White DW. Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. *Arch Environ Health.* 1985;40(4):211-214.
105. Nanni O, Amadori D, Lugaresi C, Falcini F, Scarpi E, Saragoni A, et al. Chronic lymphocytic leukaemias and non-Hodgkin's lymphomas by histological type in farming-animal breeding workers: a population case-control study based on a priori exposure matrices. *Occup Environ Med.* 1996;53(10):652-657.
106. Miligi L, Costantini AS, Bolejack V, Veraldi A, Benvenuti A, Nanni O, et al. Non-Hodgkin's lymphoma, leukemia, and exposures in agriculture: results from the Italian multicenter case-control study. *Am J Ind Med.* 2003;44(6):627-636.
107. Zheng T, Blair A, Zhang Y, Weisenburger DD, Zahm SH. Occupation and risk of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *J Occup Environ Med.* 2002;44(5):469-474.
108. Benavente Y, Costas L, Rodríguez-Suarez MM, Alguacil J, Santibáñez M, Vila J, et al. Occupational exposure to pesticides and chronic lymphocytic leukaemia in the MCC-Spain study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(14):5174.
109. Groupe Francophone des Myélodysplasies. Consensus Français sur les syndromes myélodysplasiques (SMD) et la leucémie myélomonocytaire chronique: Mise à jour 2015.
110. Pekmezovic T, Suvajdzic Vukovic N, Kisic D, Grgurevic A, Bogdanovic A, Gotic M, et al. A case-control study of myelodysplastic syndromes in Belgrade (Serbia Montenegro). *Ann Hematol.* 2006;85(8):514-519.
111. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia.* 2005;19(11):1912-1918.
112. Nisse C, Haguenoer JM, Grandbastien B, Preudhomme C, Fontaine B, Brillet JM, et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br J Haematol.* 2001;112(4):927-935.
113. Rigolin GM, Cuneo A, Roberti MG, Bardi A, Bigoni R, Piva N, et al. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. *Br J Haematol.* 1998;103(1):189-197.
114. Jin J, Yu M, Hu C, Ye L, Xie L, Jin J, et al. Pesticide exposure as a risk factor for myelodysplastic syndromes: a meta-analysis based on 1,942 cases and 5,359 controls. Hayley S, éditeur. *PLoS ONE.* 2014;9(10):e110850.
115. Van Maele-Fabry G, Duhayon S, Mertens C, Lison D. Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Res.* 2007;106(1):121-137.
116. Kellerbyrne JE, Khuder SA, Schaub EA. Meta-analysis of leukemia and farming. *Environ Res.* 1995;71(1):1-10.
117. Beane Freeman LE. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study Cohort exposed to diazinon. *Am J Epidemiol.* 2005;162(11):1070-1079.
118. Lee WJ, Blair A, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2004;96(23):1781-1789.
119. Mahajan R, Blair A, Lynch CF, Schroeder P, Hoppin JA, Sandler DP, et al. Fonofos exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect.* 2006;114(12):1838-1842.
120. Mills PK, Yang R, Riordan D. Lymphohematopoietic cancers in the united farm workers of America (UFW), 1988–2001. *Cancer Causes Control.* 2005;16(7):823-830.

121. Richardson S, Zittoun R, Bastuji-Garin S, Lasserre V, Guihenneuc C, Cadiou M, et al. Occupational risk factors for acute leukaemia: a case-control study. *Int J Epidemiol.* 1992;21(6):1063-1073.
122. Poynter JN, Richardson M, Roesler M, Blair CK, Hirsch B, Nguyen P, et al. Chemical exposures and risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in a population-based study. *Int J Cancer.* 2017;140(1):23-33.
123. Strom SS, Oum R, Elhor Gbito KY, Garcia-Manero G, Yamamura Y. De novo acute myeloid leukemia risk factors. *Cancer.* 2012;118(18):4589-4596.
124. Teyssiere R, Manangama G, Baldi I, Carles C, Brochard P, Bedos C, et al. Determinants of non-dietary exposure to agricultural pesticides in populations living close to fields: a systematic review. *Sci Total Environ.* 2021;761:143294.
125. INVS. Exposition de la population française aux polluants de l'environnement.
126. Dereumeaux C, Saoudi A, Gorla S, Wagner V, De Crouy-Chanel P, Pecheux M, et al. Urinary levels of pyrethroid pesticides and determinants in pregnant French women from the Elfe cohort. *Environ Int.* 2018;119:89-99.
127. Béranger R, Hardy EM, Dexet C, Guldner L, Zaros C, Nougadère A, et al. Multiple pesticide analysis in hair samples of pregnant French women: results from the ELFE national birth cohort. *Environ Int.* 2018;120:43-53.
128. Teitelbaum SL, Gammon MD, Britton JA, Neugut AI, Levin B, Stellman SD. Reported residential pesticide use and breast cancer risk on long island, New York. *Am J Epidemiol.* 2007;165(6):643-651.
129. Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: fact or urban legend? *Toxicol Lett.* 2013;223(3):295-305.
130. Giulivo M, Lopez de Alda M, Capri E, Barcelo D. Human exposure to endocrine disrupting compounds: their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environ Res.* 2016;151:251-264.
131. Thompson B, Coronado GD, Grossman JE, Puschel K, Solomon CC, Islas I, et al. Pesticide take-home pathway among children of agricultural workers: Study design, methods, and baseline findings. *J Occup Environ Med.* 2003;45(1):42-53.
132. Fenske RA, Lu C, Barr D, Needham L. Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. *Environ Health Perspect.* 2002;110(5):549-553.
133. Chen M, Chang C-HCC-H, Tao L, Lu C. Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: A meta-Analysis. *Pediatrics.* 2015;136(4):719-729.
134. Hyland C, Laribi O. Review of take-home pesticide exposure pathway in children living in agricultural areas. *Environ Res.* 2017;156:559-570.
135. Bradman A, Castorina R, Barr DB, Chevrier J, Harnly ME, Eisen EA, et al. Determinants of organophosphorus pesticide urinary metabolite levels in young children living in an agricultural community. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(4):1061-1083.
136. Arcury TA, Grzywacz JG, Barr DB, Tapia J, Chen H, Quandt SA. Pesticide urinary metabolite levels of children in Eastern North Carolina farmworkers households. *Environ Health Perspect.* 2007;115(8):1254-1260.
137. Coronado GD, Holte S, Vigoren E, Griffith WC, Barr DB, Faustman E, et al. Organophosphate pesticide exposure and residential proximity to Nearby fields. *J Occup Environ Med.* 2011;53(8):884-891.
138. McCauley LA, Michaels S, Rothlein J, Muniz J, Lasarev M, Ebbert C. Pesticide exposure and self reported home hygiene: practices in agricultural families. *AAOHN J.* 2003;51(3):113-119.
139. Buckley JD, Robison LL, Swotinsky R, Garabrant DH, LeBeau M, Manchester P, et al. Occupational exposures of parents of children with acute nonlymphocytic leukemia: a report from the Childrens Cancer Study Group. *Cancer Res.* 1989;49(14):4030-4037.
140. Lowengart RA, Peters JM, Cicioni C, Buckley J, Bernstein L, Preston-Martin S, et al. Childhood leukemia and parents' occupational and home exposures. *J Natl Cancer Inst.* 1987;79(1):39-46.

141. Van Maele-Fabry G, Gamet-Payraastre L, Lison D. Residential exposure to pesticides as risk factor for childhood and young adult brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Environ Int.* 2017;106:69-90.
142. Shim YK, Mlynarek SP, van Wijngaarden E. Parental exposure to pesticides and childhood brain cancer: U.S. atlantic coast childhood brain cancer study. *Environ Health Perspect.* 2009;117(6):1002-1006.
143. Nougadère A, Sirot V, Kadar A, Fastier A, Truchot E, Vergnet C, et al. Total diet study on pesticide residues in France: levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. *Environ Int.* 2012;45(1):135-150.
144. Barnat S, Boisset M, Casse F, Catteau M, Lecerf J-M, Veschambre D, et al. Pesticide residues intake of French adults under increased consumption of fresh fruits and vegetables – A theoretical study. *J Environ Sci Health B.* 2010;45(2):102-107.
145. Orton F, Ermler S, Kugathas S, Rosivatz E, Scholze M, Kortenkamp A. Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278(3):201-208.
146. EFSA. 2008 : Annual Report on Pesticide Residues. *EFSA Journal.* 2010;1-442.
147. EFSA. The 2016 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 2018;16(7).
148. EFSA. The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J.* 2020;18(4):1-103.
149. Hochane M, Trichet V, Pecqueur C, Avril P, Oliver L, Denis J, et al. Low-dose pesticide mixture induces senescence in normal mesenchymal stem cells (MSC) and promotes tumorigenic phenotype in premalignant MSC. *Stem cells* 2017;35(3):800-811.
150. Shafat MS, Oellerich T, Mohr S, Robinson SD, Edwards DR, Marlein CR, et al. Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral microenvironment. *Blood.* 2017;129(10):1320-1332.
151. Leveque X, Hochane M, Geraldo F, Dumont S, Gratas C, Oliver L, et al. Low-dose pesticide mixture induces accelerated mesenchymal stem cell aging in vitro. *Stem cells.* 2019;37(8):1083-1094.
152. Hurt S et al. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology - 2nd Edition. Krieger, R. Elsevier, 2010;
153. Institut National de Recherche et de Sécurité. Mancozèbe - Fiche toxicologique n°277. 2010.
154. Higo A, Ohtake N, Saruwatari K, Kanzaki T. Photoallergic contact dermatitis from mancozeb, an agricultural fungicide. *Contact Dermatitis.* 1996;35(3):183-183.
155. Koch P. Occupational allergic contact dermatitis and airborne contact dermatitis from 5 fungicides in a vineyard worker. Cross-reactions between fungicides of the dithiocarbamate group? *. *Contact Dermatitis.* 1996;34(5):324-329.
156. Steenland K, Cedillo L, Tucker J, Hines C, Sorensen K, Deddens J, et al. Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico. *Environ Health Perspect.* 1997;105(10):1126-1130.
157. Panganiban L, Cortes-Maramba N, Dioquino C, Suplido ML, Ho H, Francisco-Rivera A, et al. Correlation between blood ethylenethiourea and thyroid gland disorders among banana plantation workers in the Philippines. *Environ Health Perspect.* 2004;112(1):42-45.
158. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol.* 2009;169(8):919-926.
159. Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, et al. Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol.* 2018;47(1):299-310.
160. International Agency for Research on Cancer - IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to Humans. Disponible sur: <https://monographs.iarc.fr>.
161. Nordby K-C, Andersen A, Irgens LM, Kristensen P. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scand J Work Environ Health.* 2005;31(2):89-96.
162. Paro R, Tiboni GM, Buccione R, Rossi G, Cellini V, Canipari R, et al. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;260(2):155-161.

163. Calviello G, Piccioni E, Boninsegna A, Tedesco B, Maggiano N, Serini S, et al. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;211(2):87-96.
164. Colle D, Farina M, Ceccatelli S, Raciti M. Paraquat and maneb exposure alters rat neural stem cell proliferation by inducing oxidative stress: New insights on pesticide-induced neurodevelopmental toxicity. *Neurotox Res.* 2018;34(4):820-833.
165. Kim K-H, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ.* 2017;575:525-535.
166. Foucault A, Vallet N, Ravalet N, Picou F, Bene MC, Gyan E, et al. Occupational pesticide exposure increases risk of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of case-control studies including 3,955 cases and 9,948 controls. *Sci Rep.* 2021;11(1):1-13.
167. Li Y, Willer C, Sanna S, Abecasis G. Genotype Imputation. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10(1):387-406.
168. Luo H-R, Wu G-S, Pakstis AJ, Tong L, Oota H, Kidd KK, et al. Origin and dispersal of atypical aldehyde dehydrogenase ALDH2*487Lys. *Gene.* 2009;435(1-2):96-103.
168. Brooks PJ, Enoch M-A, Goldman D, Li T-K, Yokoyama A. The Alcohol Flushing Response: An unrecognized risk factor for esophageal cancer from alcohol consumption. *PLoS Med.* 2009;6(3):e1000050.
170. Yoshida A, Huang IY, Ikawa M. Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. *Proc Natl Acad Sci.* 1984;81(1):258-261.
171. Lai C-L, Yao C-T, Chau G-Y, Yang L-F, Kuo T-Y, Chiang C-P, et al. Dominance of the inactive Asian variant over activity and protein contents of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 in Human liver. *Alcohol Clin Exp Res.* 2014;38(1):44-50.
172. Chen Y-C, Peng G-S, Tsao T-P, Wang M-F, Lu R-B, Yin S-J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for overcoming acetaldehyde-induced adverse reaction in Asian alcoholics, heterozygous for the variant ALDH2 *2 gene allele. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(8):588-599.
173. Harada S, Agarwal DP, Goedde HW. Aldehyde dehydrogenase deficiency as cause of facial flushing reaction to alcohol in Japanese. *Lancet Lond Engl.* 1981;2(8253):982.
174. Kouzi F, Zibara K, Bourgeais J, Picou F, Gallay N, Brossaud J, et al. Disruption of gap junctions attenuates acute myeloid leukemia chemoresistance induced by bone marrow mesenchymal stromal cells. *Oncogene.* 2019;39(6):1198-1212.
175. Herault O, Hope KJ, Deneault E, Mayotte N, Chagraoui J, Wilhelm BT, et al. A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells. *J Exp Med.* 2012;209(5):895-901.
176. Crane MM, Annegers JF, Godwin JE, Keating MJ. Is histological subtype a marker for environmental exposures in acute myelogenous leukemia? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992;1(3):183-188.
177. Adegoke OJ, Blair A, Shu XO, Sanderson M, Jin F, Dosemeci M, et al. Occupational history and exposure and the risk of adult leukemia in Shanghai. *Ann Epidemiol.* 2003;13(7):485-494.
178. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 2019;366(6465):eaan4673.
179. Guermouche H, Ravalet N, Gallay N, Deswarte C, Foucault A, Beaud J, et al. High prevalence of clonal hematopoiesis in the blood and bone marrow of healthy volunteers. *Blood Adv.* 2020;4(15):3550-3557.
180. Oguma S, Yoshida Y, Uchino H, Maekawa T, Nomura T, Mizoguchi H. Clinical characteristics of Japanese patients with primary myelodysplastic syndromes: a co-operative study based on 838 cases. *Leuk Res.* 1995;19(3):219-225.
181. Matsuda A, Germing U, Jinnai I, Misumi M, Kuendgen A, Knipp S, et al. Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2005;106(8):2633-2640.
182. Dandré F, Cassaigne A, Iron A. The frequency of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase I2 (atypical) allele in Caucasian, Oriental and African black populations determined by the restriction profile of PCR-amplified DNA. *Mol Cell Probes.* 1995;9(3):189-193.

183. Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature*. 2012;489(7417):571-575.
184. Langevin F, Crossan GP, Rosado I V., Arends MJ, Patel KJ. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature*. 2011;475(7354):53-58.
185. Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum Genet*. 1992;88(3):344-346.
186. Li H, Borinskaya S, Yoshimura K, Kal'ina N, Marusin A, Stepanov VA, et al. Refined geographic distribution of the oriental aldh2*504lys (nee 487lys) variant. *Ann Hum Genet*. 2009;73(3):335-345.
187. Yabe M, Koike T, Ohtsubo K, Imai E, Morimoto T, Takakura H, et al. Associations of complementation group, ALDH2 genotype, and clonal abnormalities with hematological outcome in Japanese patients with Fanconi anemia. *Ann Hematol*. 2019;98(2):271-280.
188. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, et al. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013;122(18):3206-3209.
189. Ugai T, Kanda Y, Morishima Y, Matsuo K. Role of genetic polymorphism of ALDH2 in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(8):1374-1380.
190. Fitzmaurice AG, Rhodes SL, Cockburn M, Ritz B, Bronstein JM. Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. *Neurology*. 2014;82(5):419-426.
191. Kamino K, Nagasaka K, Imagawa M, Yamamoto H, Yoneda H, Ueki A, et al. Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(1):192-196.
192. Katz N, Rader DJ. Manganese homeostasis: from rare single-gene disorders to complex phenotypes and diseases. *J Clin Invest*. 2019;129(12):5082-5085.
193. Case AJ, Madsen JM, Motto DG, Meyerholz DK, Domann FE. Manganese superoxide dismutase depletion in murine hematopoietic stem cells perturbs iron homeostasis, globin switching, and epigenetic control in erythrocyte precursor cells. *Free Radic Biol Med*. 2013;56(1):17-27.
194. EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for manganese. *EFSA J*. 2013;11(11):1-44.
195. ANSES. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Saisine N°2016-SA-0203.
196. Mie A, Andersen HR, Gunnarsson S, Kahl J, Kesse-Guyot E, Rembiałkowska E, et al. Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review. *Environ Health*. 2017;16(1):111.
197. Brantsæter AL, Ydersbond TA, Hoppin JA, Haugen M, Meltzer HM. Organic food in the diet: exposure and health implications. *Annu Rev Public Health*. 2017;38:295-313.
198. Bradbury KE, Balkwill A, Spencer EA, Roddam AW, Reeves GK, Green J, et al. Organic food consumption and the incidence of cancer in a large prospective study of women in the United Kingdom. *Br J Cancer*. 2014;110(9):2321-2326.
199. Baudry J, Assmann KE, Touvier M, Allès B, Seconda L, Latino-Martel P, et al. Association of frequency of organic food consumption with cancer risk: findings from the NutriNet-Santé prospective cohort study. *JAMA Intern Med*. 2018;178(12):1597-1606.
200. Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 2008;321(5895):1493-1495.
201. Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev*. 2014;94(1):1-34.
202. Hirohashi K, Ohashi S, Amanuma Y, Nakai Y, Ida T, Baba K, et al. Protective effects of Alda-1, an ALDH2 activator, on alcohol-derived DNA damage in the esophagus of human ALDH2*2 (Glu504Lys) knock-in mice. *Carcinogenesis*. 2020;41(2):194-202.
203. Hu J, Tian W, Zhou R, Zhang Y, Lv J, Zhu J, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new ALDH2 activators. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2019;23(3):255-262.

Annexe 1 : Pesticides classés par le CIRC

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

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

LISTE DES SUBSTANCES PESTICIDES CLASSÉES 1 ET 2A

CLASSEMENT	PESTICIDES
GROUPE 1 (Cancérogène certain)	Arsenic et ses dérivés inorganiques, Lindane, Pentachlorophénol
GROUPE 2A (Cancérogène probable)	Captafol DDT, Diazinon, Dibromure d'éthylène, Glyphosate, Insecticides non arsenicaux (exposition professionnelle lors de l'épandage/application) Malathion,

Impact des pesticides sur le microenvironnement médullaire des hémopathies myéloïdes

Résumé

L'impact de l'exposition aux pesticides sur la santé humaine constitue aujourd'hui une problématique majeure de santé publique. S'il est établi que l'exposition aux pesticides induit des hémopathies lymphoïdes, leur implication est peu connue dans les hémopathies myéloïdes.

Dans une première étape le risque de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) chez les professionnels exposés à de fortes doses de pesticides a été étudié en réalisant une méta-analyse des études cas-témoins publiées depuis 1946, incluant 3955 cas de LAM et 9948 contrôles. Une association significative entre LAM et exposition aux pesticides a été objectivée (OR = 1,51 ; 95%IC : 1,10-2,08). L'OR n'était pas modifié par l'analyse de sensibilité. L'absence de biais de publication a été vérifiée par l'analyse de la symétrie du diagramme de Funnel et par le test d'Egger. L'addition séquentielle d'études de la première à la dernière publiée a montré que la significativité a été trouvée après le cumul de 8 études de 1986 à 2010 (OR = 1,48 ; 95%IC : 1,08-2,04). Après stratification des études l'association était plus forte dans : la population asiatique (OR = 1,74 ; 95%IC : 1,32-2,30) et chez les patients exposés aux insecticides (OR = 1,47 ; 95%IC : 1,15-1,88).

De plus, les effets biologiques d'un cocktail de faibles doses de pesticides ont été étudiés sur des cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) médullaires de sujets sains, et comparés à des CSM de patients atteints d'un syndrome myélodysplasique (SMD), une affection pré-leucémique. Les pesticides altèrent l'expression de l'aldéhyde deshydrogénase-2 (ALDH2) en augmentant l'acétaldéhyde, avec l'induction concomitante d'un stress oxydatif, de sénescence, de cassures de l'ADN et d'un défaut de soutien de l'hématopoïèse. Ces mêmes anomalies ont été retrouvées dans les CSM de SMD, suggérant un rôle des pesticides via l'ALDH2 dans la physiopathologie des SMD.

Mots clefs : exposition aux pesticides / cellules souches/stromales mésenchymateuses / leucémie aiguë myéloblastique / syndrome myélodysplasique / ALDH2 / hématopoïèse

Résumé en anglais

The impact of pesticide exposure on human health is a major public health concern. While it is well established that exposure to pesticides induces lymphoid hematologic disease, little is known about their involvement in myeloid malignancies.

In a first step, the risk of acute myeloid leukemia (AML) in professionals exposed to high doses of pesticides was studied by performing a stringent meta-analysis of case-control studies published since 1946, including 3,955 cases of AML and 9,948 controls. A significant association between AML and occupational pesticide exposure was established (OR = 1.51; 95% CI: 1.10-2.08). The OR was not affected by the sensitivity analysis. Absence of publication bias was shown with Funnel plot's symmetry and Egger's-test. The sequential addition of studies from the first to the last published showed that the significance was found after the accumulation of 8 studies from 1986 to 2010 (OR = 1.48; 95% CI: 1.08-2.04). Stratified analysis showed that the association was stronger in: the Asian population (OR = 1.74; 95% CI: 1.32-2.30) and patients exposed to insecticides (OR = 1.47; 95% CI: 1.15-1.88).

In addition, the biological effects of low doses of pesticides mixture were studied on bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) from healthy subjects and compared to MSCs from patients with myelodysplastic syndrome (MDS), a pre-leukemic disease. Pesticides alter the expression of aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) and increased the level of acetaldehyde, with the concomitant induction of oxidative stress, senescence, DNA damage and defective hematopoietic support. These same abnormalities were found in BM-MSCs from MDS patients, suggesting a role of pesticides via ALDH2 in the pathophysiology of MDS.

Keywords: pesticides exposure / mesenchymal stem/stromal cells / acute myeloid leukemia / myelodysplastic syndrome / ALDH2 / hematopoiesis