



HAL
open science

Étude ex vivo de l'impact des nanopesticides de cuivre sur le système immunitaire systémique et intestinal

Sarah Dupont

► **To cite this version:**

Sarah Dupont. Étude ex vivo de l'impact des nanopesticides de cuivre sur le système immunitaire systémique et intestinal. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04802975

HAL Id: dumas-04802975

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04802975v1>

Submitted on 25 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

L'Institut Agro Rennes-Angers
 Site d'Angers Site de Rennes

Année universitaire : 2023...-...2024.

Spécialité :

.....Agroalimentaire.....

Spécialisation (et option éventuelle) :

.....BMC.....

Mémoire de fin d'études

d'ingénieur de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)

de master de l'Institut Agro Rennes-Angers (Institut national d'enseignement supérieur pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement)

de l'Institut Agro Montpellier (étudiant arrivé en M2)

d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

ETUDE EX VIVO DE L'IMPACT DES NANOPESTICIDES DE CUIVRE SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE SYSTÉMIQUE ET INTESTINAL

Par : Sarah DUPONT

Soutenu à Rennes, le 10/06/2024

Devant le jury composé de :

Président : Luc Paillard

Maître de stage : Bruno Lamas

Enseignant référent : Frédéric Lecerf

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Sophie Allais (jury)

Anne Corlu (jury)

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle de l'Institut Agro Rennes-Angers

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation «Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France» disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



**ETUDE *EX VIVO* DE L'IMPACT DES
NANOPESTICIDES DE CUIVRE SUR LE
SYSTÈME IMMUNITAIRE SYSTÉMIQUE ET
INTESTINAL**

INRAE – UMR 1331 TOXALIM

EQUIPE ENTÉRISK

SARAH DUPONT

MASTER BMC - 2023/2024

L'INSTITUT AGRO RENNES ANGERS

UNIVERSITÉ DE RENNES

ENCADRANTS :

DR. BRUNO LAMAS

CHARGÉ DE RECHERCHE

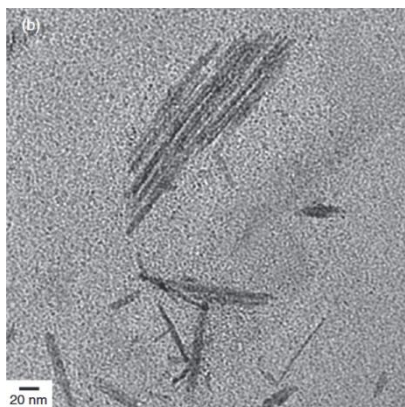
DR. YANN MALAÏSÉ

POST-DOCTORANT

1) Pesticides et nanopesticides à base de cuivre

Le cuivre (Cu) est utilisé en agriculture depuis plusieurs décennies pour ses propriétés fongicides, et plus particulièrement dans les vignobles (bouillie bordelaise) contre le mildiou (*Plasmopara viticola*) (1). Dans les pays les plus producteurs de vins tels que l'Italie, l'Espagne et la France, l'utilisation accrue des pesticides de cuivre, comme le Kocide 2000 ®, entraîne des problèmes liés à l'accumulation de Cu dans les sols et dans les nappes phréatiques (1). De plus, le Cu peut aussi être bioaccumulé par certains végétaux, ce qui renforce les problématiques liées à la sécurité alimentaire et environnementale (2). Or, en UE, les zones où les concentrations de Cu dans le sol sont supérieures à la valeur seuil (« *threshold value* »), c'est-à-dire la valeur pour laquelle une évaluation plus approfondie des risques pour l'environnement et la santé humaine est nécessaire, sont plus élevées que pour d'autres métaux lourds (3). Ainsi, en 2018, la commission européenne a imposé une restriction sur l'utilisation du Cu en agriculture (conventionnelle et biologique) à hauteur de 28 kg/ha sur 7 ans ou 4 kg/ha par an pendant 7 ans, selon les états (4). Cette réglementation n'étant valable que jusqu'en 2025, il est nécessaire de trouver des alternatives pour remplacer ou limiter l'utilisation du Cu en agriculture.

Des pesticides à base de Cu sous forme nanométrique i.e. nanopesticides de Cu (NPC), constituent une alternative aux pesticides classiques et sont déjà utilisés en agriculture conventionnelle et biologique hors UE. La taille nanométrique du composé cuivré (entre 1 et 100 nm) permet une solubilité plus importante, une plus forte dispersion et donc une meilleure efficacité d'absorption par les organismes. Cela conduit à des effets antifongiques et antibactériens plus importants que les pesticides conventionnels, corrélés à une réduction des taux d'applications et donc des conséquences environnementales (5). Parmi les NPC commerciaux, le Kocide 3000 ® est l'un des plus utilisés en agriculture conventionnelle et biologique contre les infections bactériennes et fongiques. Le principe actif de ce nanopesticide est constitué de nano-aiguilles de dihydroxyde de cuivre ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) (**Figure 1**) (6).



Compte tenu de la nécessité de réduire les usages de Cu, ces nanopesticides sont susceptibles d'être rapidement mis sur le marché européen et d'être pulvérisés dans les agroécosystèmes français. Toutefois, le nombre très limité de données sur le devenir environnemental et les impacts sur la santé de ces agents ne permet pas d'évaluer le risque spécifique lié à leur taille nanométrique. Il est donc primordial d'apporter de nouvelles données afin d'aider les politiques publiques dans leurs décisions à autoriser ou non la mise sur le marché Européen de tels produits.

Figure 1 : Nanoparticules de Kocide 3000 par microscopie électronique en transmission (Li et al., 2019) (6)

2) *Nanopesticides de cuivre et exposition*

Différentes études ont démontré que les nanoparticules (NP) de Cu contenues dans les NPC peuvent s'accumuler dans les végétaux traités avec ces agents (7). La consommation de ces végétaux, associée aux autres sources potentielles de Cu, pourrait conduire à l'ingestion d'une dose de Cu supérieure aux doses journalières recommandées, notamment dans le cadre d'une alimentation variée. Or, de par leur petite taille, les NP de Cu potentiellement ingérées *via* notre alimentation sont plus à même de traverser les barrières biologiques (8), notamment la barrière gastrointestinale, première barrière contre les contaminants alimentaires. La barrière intestinale est une interface organisée en différentes composantes dont les plus importantes sont l'épithélium intestinal, le microbiote intestinal et le système immunitaire (SI) intestinal. Dans un organisme sain, ces trois structures coopèrent pour maintenir un équilibre appelé « homéostasie intestinale » qui permet notamment de protéger l'hôte contre d'éventuels pathogènes/substances toxiques provenant de l'alimentation tout en garantissant l'absorption des nutriments (9). Après ingestion, les NPC pourraient ainsi interagir avec cet axe microbiote-épithélium-SI intestinal et déréguler cette homéostasie ce qui pourrait endommager la fonction de la barrière intestinale. L'inflammation intestinale et systémique sont des facteurs importants dans le développement de maladies chroniques, telles que le diabète, l'obésité et autres maladies gastrointestinales (maladie de Crohn et maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) (10). Ainsi, une altération de la réponse immunitaire induite par une ingestion chronique de NPC pourrait contribuer à la susceptibilité à ces maladies.

3) *Le système immunitaire*

a. *Fonction et composition du système immunitaire*

Le système immunitaire intestinal étant crucial pour l'homéostasie de la barrière intestinale, le potentiel immunotoxique des composés auxquelles l'Homme est exposé doit être pris en compte. En effet, si le SI intestinal est capable d'induire des réponses inflammatoires pour lutter contre des agents pathogènes, il permet également de tolérer les antigènes issus de l'alimentation et du microbiote intestinal. Cet équilibre entre tolérance et inflammation participe au maintien de l'homéostasie intestinale et systémique. Une altération de cet équilibre pourrait aussi induire une réponse inflammatoire importante aboutissant au développement de pathologies liées à l'immunité (11). Les mécanismes clés permettant l'homéostasie intestinale sont médiés par des cellules spécialisées de l'immunité innée (défense immédiate et moins spécifique) et de l'immunité adaptative (défense plus tardive et plus spécifique). Parmi elles, les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui participent à la réponse immune *via* leur capacité de phagocytose et de

présentation de l'antigènes ainsi que par leur production de cytokines et de chimiokines. De même, les cellules dendritiques (DC) font aussi partie l'immunité innée. Elles sont spécialisées dans la fonction de présentation des antigènes et donc essentielles pour l'activation de l'immunité adaptative. En effet, les DC vont pouvoir présenter les antigènes aux lymphocytes T (LT), principaux acteurs de l'immunité adaptative, leur permettant ensuite de se différencier en sous-types ayant chacun une fonction spécifique dans la réponse immunitaire cellulaire (T spécifique) (12). La réponse T spécifique est importante pour le maintien de l'équilibre entre immunité et tolérance au niveau de la barrière intestinale (13). Cette réponse est médiée par des LT aux capacités pro-inflammatoires, principalement les LT helper (Th)17 et Th1, et des lymphocytes ayant des propriétés anti-inflammatoires, les LT régulateurs (Treg). De par leur sécrétion de cytokines spécifiques (**Figure 2**), ces LT peuvent avoir un rôle cytotoxique pour les pathogènes ou participer à la réponse tolérogène et ainsi réguler la réponse inflammatoire (14). Les cytokines sont des molécules signalétiques clés, qui permettent d'orienter la réponse immunitaire par le recrutement d'autres cellules immunitaires spécifiques, en activant ou inhibant la fonction de ces cellules ou encore en régulant leur prolifération ou leur différenciation (15).

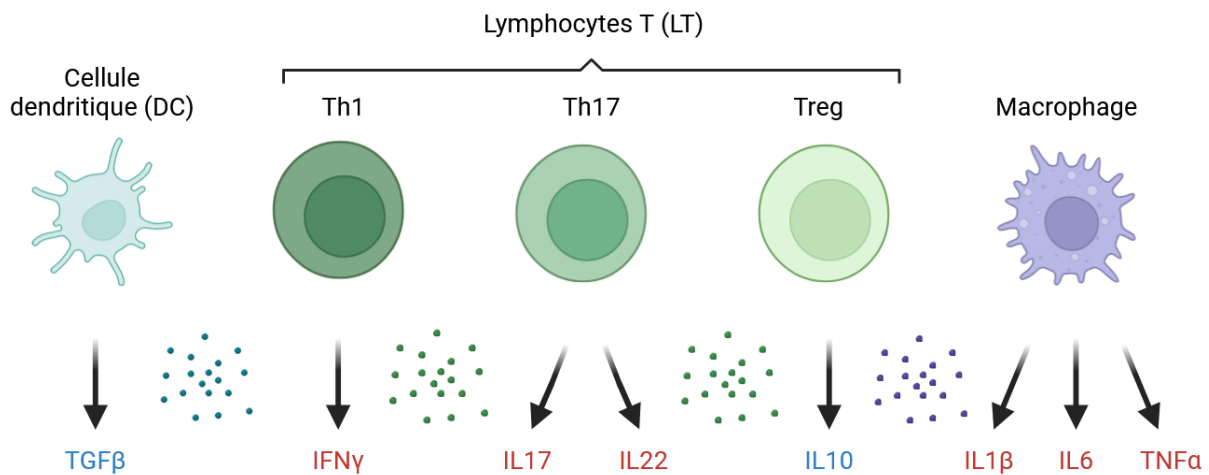


Figure 2 : Exemple simplifié de cytokines (bleu : anti-inflammatoire, rouge : pro-inflammatoire) sécrétées par différents types cellulaires de l'immunité

b. Le système immunitaire intestinal

Environ 70 % des cellules immunitaires de l'organisme se trouvent dans l'intestin et forment le tissu lymphoïde associé au tube digestif ou GALT (gut-associated lymphoid tissue) (16). Il est composé majoritairement de lymphocytes T et B, de macrophages et de DC isolés au sein de la *lamina propria* (tissu conjonctif de l'intestin) ou organisés dans des structures lymphoïdes, telles que les nœuds mésentériques lymphatiques (MLN) et les plaques de Peyer (PP), régions clés dans l'initiation de la réponse immunitaire intestinale (17). En effet, les PP sont les premiers organes immunitaires lymphoïdes impliqués lors de l'exposition à un antigène par ingestion (**Figure 3**). Ils

sont les sites de reconnaissances des pathogènes les plus importants au niveau de l'intestin et contiennent différents types de cellules immunitaires, dont les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les macrophages. Les PP sont impliquées dans l'échantillonnage d'antigènes présents dans la lumière intestinale et dans leur présentation par les DC aux lymphocytes (**Figure 3**). Ainsi, la principale fonction des PP est d'initier une réponse immunitaire antigène-dépendante qui se propage au reste de la muqueuse gastro-intestinale (18). Cette réponse est notamment médiée par le lien direct entre les PP et les MLN. Les MLN sont des structures hautement organisées qui agissent comme un filtre pour le circuit lymphatique et permettent les interactions entre les différentes cellules immunitaires. Ils sont responsables de la réponse immunitaire en cas de reconnaissance d'un antigène pathogène dans l'intestin et de la tolérance aux antigènes alimentaires et ceux des bactéries commensales (bactéries bénéfiques pour l'hôte) (17).

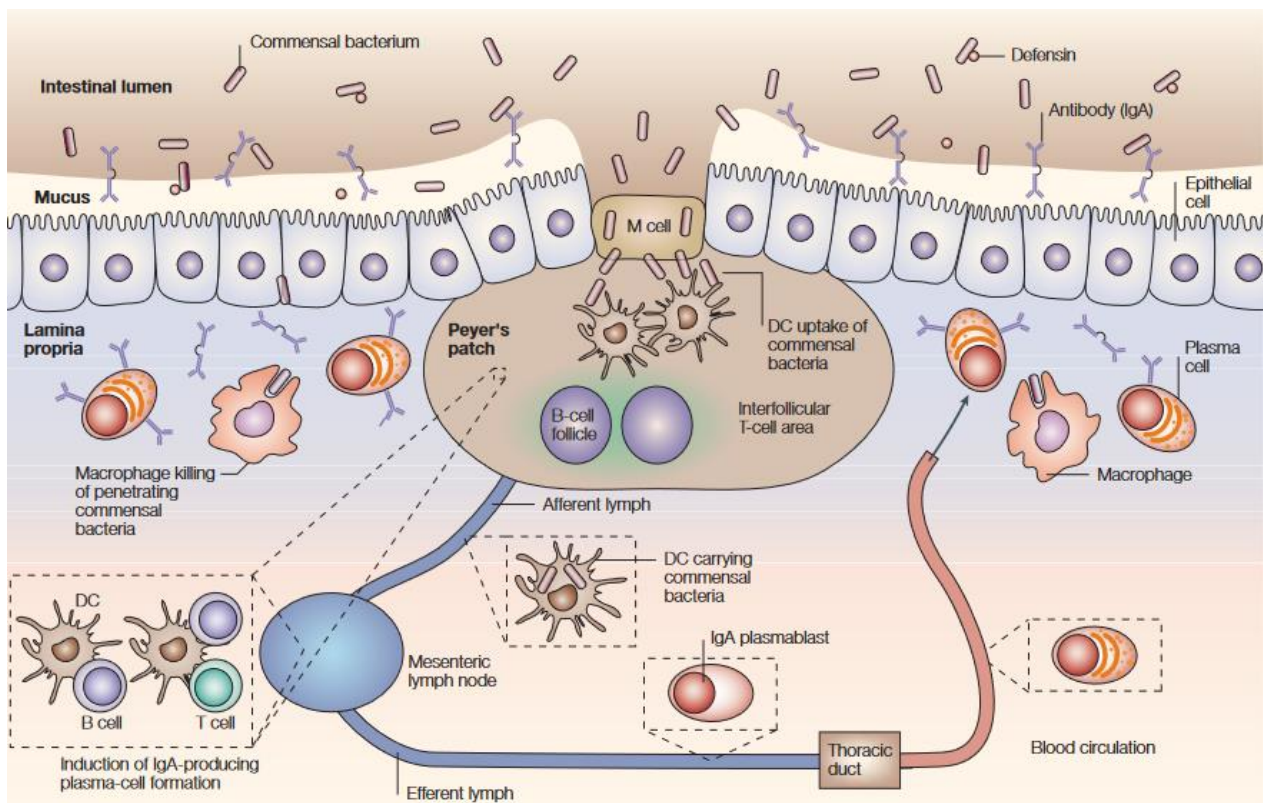


Figure 3 : Système immunitaire de l'intestin (Macpherson and Harris, 2004) (19)

Les différentes populations de cellules immunitaires abritées par ces structures lymphoïdes coopèrent pour induire une réponse immunitaire adaptée en cas de reconnaissance d'un antigène pathogène. Les DC des PP ou de la *lamina propria*, peuvent migrer dans les MLN et présenter l'antigène capturé aux lymphocytes T naïfs qui, après leur différenciation, migrent ensuite dans la *lamina propria*. En condition d'homéostasie intestinale, les DC favorisent l'induction de la réponse tolérogène en activant les lymphocytes Tregs, capables de produire de l'interleukine 10 (IL10) aux propriétés anti-inflammatoires, grâce à la sécrétion de TGF β (20). En présence d'un pathogène, les

cellules de l'immunité innée produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL1 β et l'IL6 et initient la réponse immunitaire adaptative en recrutant les lymphocytes T produisant notamment de l'IFN γ , de l'IL17 et de l'IL22 (**Figure 2**) (20) (14).

c. Lien avec l'immunité systémique

L'intestin étant le plus grand compartiment du système immunitaire à l'échelle de l'organisme, un impact sur le système immunitaire intestinal peut également avoir un impact sur le système immunitaire de l'organisme en systémique, du fait du dialogue entre la circulation lymphatique et la circulation sanguine (21). Les NPC ingérés qui passent la barrière intestinale peuvent atteindre la circulation systémique et s'accumuler dans différents organes dont le foie et la rate. Ainsi, les NP de Cu issues des NPC peuvent être prises en charge par les cellules immunitaires au niveau intestinal mais aussi au niveau splénique. De plus, la rate étant le plus gros organe lymphoïde secondaire du corps humain, elle représente un bon indicateur de l'état de la réponse immunitaire systémique (22).

4) Impacts des NPC sur le système immunitaire intestinal et systémique

Le peu d'études évaluant l'impact du Kocide 3000 ® s'est essentiellement focalisé sur la caractérisation physico-chimique de ce produit, son devenir dans l'environnement et sa toxicité sur des organismes cibles tels que les plantes et certaines communautés microbiennes des sols (23). Toutefois, différentes études montrent qu'à forte concentration, le Cu peut induire une inflammation chez certains animaux (24–26), *via* notamment l'induction d'un stress oxydatif et la production d'espèces réactives de l'oxygène (27). Malgré le potentiel inflammatoire du Cu et la capacité des NPs de Cu issues du Kocide 3000 ® à passer la barrière intestinale et à interagir avec les cellules immunitaires, très peu d'études ont évalué les conséquences d'une exposition à ce NPC sur la réponse immunitaire d'organismes non-cibles, terrestres ou aquatiques. Seule une étude montre qu'une exposition au Kocide 3000 ® (2, 4 et 8 mg/L) pendant 72h, sur des embryons et des larves de poissons zèbres, induit des malformations et augmente l'expression de gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires (28). Le nombre limité de données sur les impacts du Kocide 3000 ® ne permet pas d'évaluer les potentiels effets de ce NPC sur la fonction immunitaire.

Dans ce contexte, l'objectif de mon stage est d'évaluer l'impact direct d'une exposition au Kocide 3000 ® sur la réponse immunitaire intestinale et systémique, chez la souris. Les effets du Kocide 3000 ® seront comparés à ceux d'un pesticide conventionnel à base de Cu(OH) $_2$ non nano-dimensionné commercialisé par le même fabricant, le Kocide 2000 ®.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Ortega P, Sánchez E, Gil E, Matamoros V (2022). Use of cover crops in vineyards to prevent groundwater pollution by copper and organic fungicides. *Soil column studies. Chemosphere*. 303:134975.
2. Ballabio C, Panagos P, Lugato E, Huang JH, Orgiazzi A, Jones A, et al (2018). Copper distribution in European topsoils: An assessment based on LUCAS soil survey. *Science of The Total Environment*. 636:282-98.
3. Tóth G, Hermann T, Da Silva MR, Montanarella L (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International*. 88:299-309.
4. Commission Européenne. Règlement (UE) 2018/1981. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1981>
5. Gulmez O, Aksakal O, Baris O, Bayram E (2023). *Pseudomonas stutzeri* improves the tolerance of *Lemna minor* to Cu(OH)₂ nanopesticide by regulating the uptake of copper, antioxidant defense mechanisms, and the expression of metacaspase-1, chlorophyllase, and stress-responsive genes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 203:108002.
6. Li J, Rodrigues S, Tsyusko OV, Unrine JM (2019). Comparing plant–insect trophic transfer of Cu from lab-synthesised nano-Cu(OH)₂ with a commercial nano-Cu(OH)₂ fungicide formulation. *Environ Chem*. 16(6):411.
7. Zhao L, Huang Y, Hannah-Bick C, Fulton AN, Keller AA (2016). Application of metabolomics to assess the impact of Cu(OH)₂ nanopesticide on the nutritional value of lettuce (*Lactuca sativa*): Enhanced Cu intake and reduced antioxidants. *NanoImpact*. 3-4:58-66.
8. Grillo R, Fraceto LF, Amorim MJB, Scott-Fordsmand JJ, Schoonjans R, Chaudhry Q (2021). Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. *Journal of Hazardous Materials*. 404:124148.
9. Lamas B, Evariste L, Houdeau E (2023). Dysregulation along the gut microbiota-immune system axis after oral exposure to titanium dioxide nanoparticles: A possible environmental factor promoting obesity-related metabolic disorders. *Environmental Pollution*. 330:121795.
10. Rodrigues VF, Elias-Oliveira J, Pereira ÍS, Pereira JA, Barbosa SC, Machado MSG, et al (2022). *Akkermansia muciniphila* and Gut Immune System: A Good Friendship That Attenuates Inflammatory Bowel Disease, Obesity, and Diabetes. *Front Immunol*. 13:934695.

11. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 203(3):519-27.
12. Chaplin DD (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2):S3-23.
13. Le N, Mazahery C, Nguyen K, Levine AD (2021). Regulation of Intestinal Epithelial Barrier and Immune Function by Activated T Cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 11(1):55-76.
14. Majumdar S, Lin Y, Bettini ML (2022). Host-microbiota interactions shaping T-cell response and tolerance in type 1 diabetes. *Front Immunol*. 13:974178.
15. Messina JM, Luo M, Hossan MS, Gadelrab HA, Yang X, John A, et al (2023). Unveiling cytokine charge disparity as a potential mechanism for immune regulation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. S1359610123000916.
16. Vighi G, Marcucci F, Sensi L, Di Cara G, Frati F (2008). Allergy and the gastrointestinal system. *Clinical and Experimental Immunology*. 153(Supplement_1):3-6.
17. Shaikh H, Vargas JG, Mokhtari Z, Jarick KJ, Ulbrich M, Mosca JP, et al (2021). Mesenteric Lymph Node Transplantation in Mice to Study Immune Responses of the Gastrointestinal Tract. *Front Immunol*. 12:689896.
18. Wagner C, Bonnardel J, Da Silva C, Martens L, Gorvel JP, Lelouard H (2018). Some news from the unknown soldier, the Peyer's patch macrophage. *Cellular Immunology*. 330:159-67.
19. Macpherson AJ, Harris NL (2004). Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 4(6):478-85.
20. Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation (2008). *Nat Rev Immunol*. 8(6):435-46.
21. Mowat AM, Agace WW (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 14(10):667-85.
22. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC (2019). Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*. 4(33):eaau6085.
23. Simonin M, Colman BP, Tang W, Judy JD, Anderson SM, Bergemann CM, et al (2018). Plant and Microbial Responses to Repeated Cu(OH)₂ Nanopesticide Exposures Under Different Fertilization Levels in an Agro-Ecosystem. *Front Microbiol*. 9:1769.

24. Costa PM, Gosens I, Williams A, Farcas L, Pantano D, Brown DM, et al (2018). Transcriptional profiling reveals gene expression changes associated with inflammation and cell proliferation following short-term inhalation exposure to copper oxide nanoparticles. *J of Applied Toxicology*. 38(3):385-97.
25. Leite CE, Maboni LDO, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TCB, et al (2013). Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 272(3):681-9.
26. Zhang F, Zheng W, Guo R, Yao W (2017). Effect of dietary copper level on the gut microbiota and its correlation with serum inflammatory cytokines in Sprague-Dawley rats. *J Microbiol*. 55(9):694-702.
27. Yang F, Liao J, Yu W, Pei R, Qiao N, Han Q, et al (2020). Copper induces oxidative stress with triggered NF- κ B pathway leading to inflammatory responses in immune organs of chicken. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 200:110715.
28. Aksakal FI, Sisman T (2020). Developmental toxicity induced by Cu(OH)₂ nanopesticide in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology*. 35(12):1289-98.

ETUDE *EX VIVO* DE L'IMPACT D'UN NANOPESTICIDE DE CUIVRE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE SYSTEMIQUE ET INTESTINAL

INRAE – UMR 1331 TOXALIM

Equipe ENTeRisk

Sarah Dupont

Master BMC - 2023/2024

L'Institut Agro Rennes-Angers

Université de Rennes

Encadrants :

Dr. Bruno Lamas

Chargé de recherche

Dr. Yann Malaisé

Post-doctorant

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Yann Malaisé, qui m'a encadré tout au long de ce stage, et qui m'a apporté autant d'un point de vue scientifique que professionnel et humain. Je lui souhaite un MACSQuant fonctionnel et le retour des moelleux au chocolat de la cantine mais surtout un avenir professionnel épanouissant. J'espère que tu auras retenu mon prénom dans quelques années...

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe ENTeRisk/E11 dans laquelle j'ai été particulièrement bien accueillie et accompagnée au cours de mon stage. Merci à leur constante disponibilité et leur aide en tout temps. Merci notamment à Bruno pour sa patience et son accompagnement dans la préparation de mon rapport de stage et ma soutenance.

Un merci particulier à ma partenaire stagiaire et amie, Teraihere, qui m'a divertie pendant tout ce stage et même en dehors. Au plaisir de te revoir sur ta terre natale.

Je remercie aussi les membres de l'équipe NGN/E4 qui ont su nous sauver plus d'une fois et sans qui certaines pauses café auraient été bien moins animées.

Je remercie aussi mon tuteur de stage au sein de l'Institut Agro, Frédéric Lecerf, qui a su répondre à mes questions et interrogations, autant sur la rédaction de mon mémoire que sur mon avenir professionnel.

Je n'oublie pas de remercier également L'Institut Agro Rennes Angers et toutes les personnes qui m'ont accompagné dans mon parcours scolaire et qui ont su faire de mon cursus une aventure passionnante et enrichissante. Merci également au Master BMC de l'Université de Rennes 1, qui a su m'ouvrir à de nouvelles thématiques et opportunités professionnelles.

Enfin, je réserve un chaleureux remerciement à ma famille, et surtout mes parents, pour leur soutien inconditionnel dans mon épanouissement professionnel et personnel.

.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	3
Résumé	4
Abréviations	5
Introduction	6
Résultats	6
I) Détermination des doses non cytotoxiques de K3000 et de K2000	6
II) Effets d'une exposition au Kocide sur le système immunitaire intestinal et systémique	7
a) La capacité des cellules immunitaires à produire des cytokines est-elle impactée par une exposition au Kocide ?	7
b) Une exposition au Kocide altère-t-elle la prolifération des lymphocytes T ?	9
c) Quels types de cellules immunitaires sont impactés par une exposition au Kocide ?	9
Discussion et perspectives	10
Conclusion	12
Références bibliographiques	13
Gestion de projet	15

Résumé

Le manque de données sur les nanopesticides à base de nanoparticules (NPs) de Cuivre (Cu) limite l'évaluation du risque lié à l'ingestion de végétaux contaminés par ces produits. La taille de ces NPs leur permettrait de passer la barrière intestinale et interagir avec les cellules immunitaires de l'intestin. Cette étude évalue *ex vivo* l'impact du Kocide 3000 (K3000) nanoformulé, comparé au Kocide 2000 (K2000) conventionnel, sur la réponse immunitaire. Pour cela, les cellules immunitaires des MLN et des rates de souris naïves ont été isolées puis exposées *ex vivo* au K3000 ou K2000. L'impact de ces substances sur la production de cytokines, la prolifération et la différenciation de ces cellules a été évalué. L'exposition des cellules des MLN au K3000 et au K2000 induit une diminution de la production d'IL-6. Cependant, contrairement au K2000, seule une exposition au K3000 réduit la sécrétion de TGF- β ainsi que la fréquence des macrophages M2, suggérant un effet spécifique à la taille nanométrique des particules. En conclusion, nos résultats montrent qu'une exposition des cellules immunitaires des MLN au K3000 induit une réduction de la production d'IL-6/TGF- β pouvant être liée à la diminution de populations immunitaires, ce qui pourrait ainsi favoriser l'apparition de sensibilités alimentaires.

Abréviations

NP : nanoparticule

Cu : Cuivre

UE : Union Européenne

K2000 : Kocide 2000

K3000 : Kocide 3000

MLN : Nœuds Mésentériques Lymphatiques

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acétate

PMA/iono : PMA/ionomycine

CD : Cluster de Différenciation

CD3/CD28 : anticorps anti-CD3 et anti-CD28

LT : Lymphocytes T

DC : cellule dendritique

IL : Interleukine

TGF : Facteur de croissance Transformant

IFN : Interféron

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale

Th : Lymphocyte T helper

Treg : Lymphocyte T régulateurs

Introduction

Les nanopesticides à base de nanoparticules (NPs) de Cuivre (Cu) constituent une alternative aux pesticides conventionnels et sont déjà utilisés en agriculture hors Europe. Leur taille nanométrique facilite le passage systémique, pour des effets biocides plus importants que les formes conventionnelles, ce qui réduit les taux d'applications de Cu. Toutefois, le nombre limité de données ne permet pas d'évaluer le risque nanospécifique pour l'environnement et la santé humaine lié à la dissémination de NPs de Cu. Des études ont montré que des NPs inorganiques sont capables de passer la barrière épithéliale, où elles sont éventuellement prises en charge par les cellules immunitaires intestinales, mais peuvent aussi atteindre la circulation systémique et s'accumuler dans différents organes. Ainsi, après ingestion de végétaux contaminés par les nanopesticides, les NPs de Cu pourraient interagir avec les cellules immunitaires intestinales et systémiques et avoir des conséquences sur la santé. Le but de mon stage a été d'évaluer l'impact d'un nanopesticide à base de NPs de dihydroxyde de Cu ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), le Kocide 3000[®] (K3000) sur la réponse immunitaire intestinale et systémique. Les effets du K3000 ont été comparés à ceux obtenus après exposition des cellules immunitaires avec le Kocide 2000[®] (K2000), un pesticide conventionnel à base de $\text{Cu}(\text{OH})_2$, non « nanodimensionné », afin de déterminer les effets nanospécifiques du K3000.

Résultats

1) Détermination des doses non cytotoxiques de K3000 et de K2000

Le Cu est connu pour induire des effets cytotoxiques, notamment *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène. Pour déterminer les doses non cytotoxiques de K3000 et de K2000, les cellules immunitaires des nœuds mésentériques lymphatiques (MLN) et de la rate de souris naïves (non exposées aux contaminants) ont été exposées pendant 24h et 48h à différentes doses de ces produits phytosanitaires (K3000 : 0, 0.0025, 0.25, 2.5, 5 et 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; K2000 : 0, 0.00215, 0.215, 2.15, 4.3 et 21.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La viabilité cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium. Les résultats montrent une diminution de la viabilité après exposition au K3000 avec un effet significatif dès 24h pour les cellules des MLN et à 48h seulement pour les cellules de la rate aux doses de 5 et 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 1**). La viabilité cellulaire est également réduite après exposition aux fortes doses de K2000 mais les effets sont significatifs uniquement pour les cellules spléniques (**Figure 1**). L'absence de cytotoxicité du K2000 sur les cellules issues des MLN suggère que ces cellules seraient davantage sensibles aux NPs de Cu présentes dans le K3000. En se basant sur ces résultats et pour la suite de ce projet, nous avons sélectionné des concentrations de produit phytosanitaires qui n'altèrent pas la viabilité cellulaire, à savoir 0.0025, 0.025 et 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le K3000 et 0.00215, 0.0215 et 0.215 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le K2000.

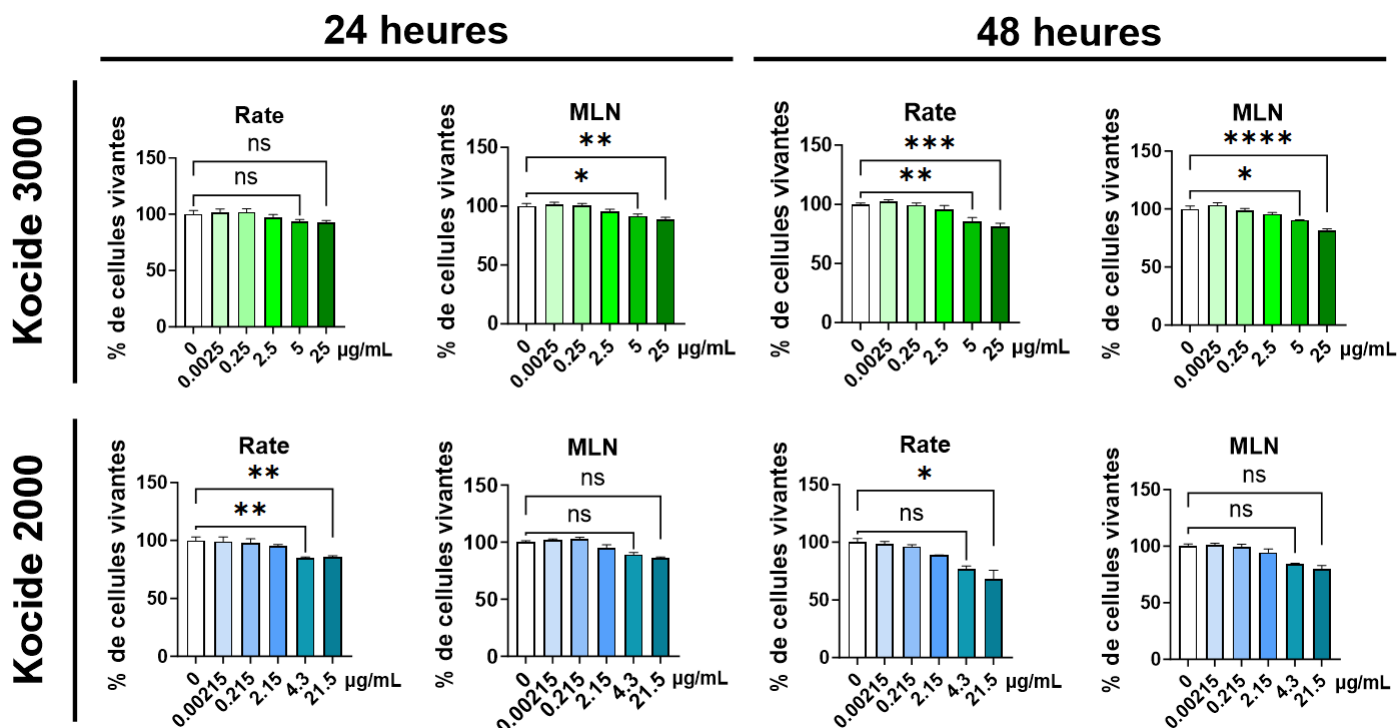


Figure 1. Détermination des concentrations non-cytotoxiques de K3000 et K2000. Les cellules immunitaires issues des MLN et des rates de souris naïves ont été exposées à 0, 0.0025, 0.25, 2.5, 5 25 µg/mL de K3000 ou 0, 0.00215, 0.215, 2.15, 4.3, 21.5 µg/mL de K2000 pendant 24h ou 48h puis marquées à l’iodure de propidium (n=3). « ns » : « non significatif » ($p > 0,05$) ; * indique $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$.

II) Effets d’une exposition au Kocide sur le système immunitaire intestinal et systémique

a) La capacité des cellules immunitaires à produire des cytokines est-elle impactée par une exposition au Kocide ?

Pour évaluer l’effet du K3000 sur la capacité des cellules immunitaires à sécréter des cytokines, les cellules des MLN et de la rate de souris naïves ont été exposées avec différentes doses de nanopesticide et stimulées, soit de façon non spécifique (toutes les cellules immunitaires) avec un mélange de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et d’ionomycine (PMA/iono), soit avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (CD3/CD28) pour induire une stimulation spécifique des Lymphocytes T (LT). La même expérimentation a été réalisée avec le K2000 et la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires a été évaluée par ELISA sur les surnageants de culture. En comparaison du contrôle, aucune différence de sécrétion du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), de l’interféron- γ (IFN- γ), de l’interleukine-17 (IL-17) et de l’IL-10 n’a été observée après exposition au K3000 ou au K2000 quelle que soit la stimulation cellulaire (données non montrées). Aux fortes concentrations de K3000, la production du facteur de croissance transformant- β (TGF- β) (**Figure 2a**) et de l’IL-6 (**Figure 2b**) par les cellules issues des MLN a été réduite, de manière indépendante du type de stimulation cellulaire. L’exposition des cellules issues des MLN aux fortes doses de K2000 a induit également une diminution de la sécrétion d’IL-6 par ces cellules stimulées par PMA/iono (**Figure 2b**) alors qu’une augmentation de la sécrétion de TGF- β a été observée après stimulation des

cellules par CD3/CD28 (**Figure 2a**). En ce qui concerne les cellules de la rate, l'exposition au K3000 n'induit aucune altération de la production d'IL-6 et de TGF- β (**Figure 2**) alors qu'une augmentation de la production d'IL-6 a été observée après exposition aux faibles concentrations de K2000 avec une stimulation par CD3/CD28 (**Figure 2b**). Ces résultats suggèrent que les cellules issues des MLN ont une sensibilité plus importante au Cu que les cellules spléniques. De plus, la diminution de la production d'IL-6 par les cellules issues des MLN, observée après exposition au K3000 et au K2000, suggère que les particules de Cu peuvent induire cet effet de manière indépendante de leur taille. En revanche, la diminution de la production de TGF- β observée uniquement après exposition au K3000 pourrait être liée à la taille nanométrique des particules de Cu.

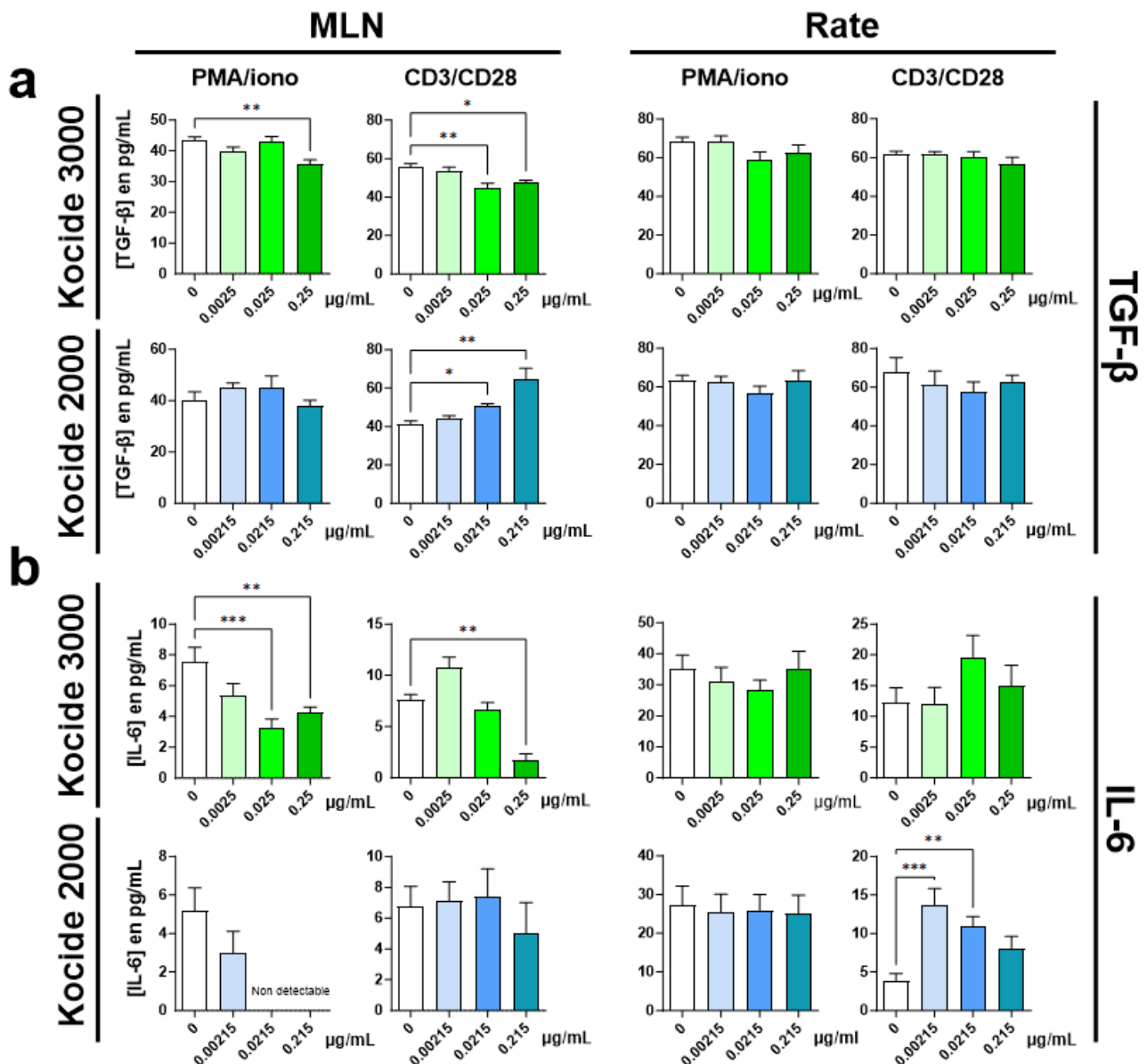


Figure 2. Impact d'une exposition *ex vivo* au K3000 et au K2000 sur la production de TGF- β (**a**) et d'IL-6 (**b**) par les cellules immunitaires des MLN et de la rate. Les cellules immunitaires issues des MLN et des rates de souris naïves ont été exposées à 0, 0.0025, 0.025, 0.25 μ g/mL de K3000 ou 0, 0.00215, 0.0215, 0.215 μ g/mL de K2000 pendant 24h (stimulation CD3/CD28) ou 48h (stimulation PMA/ionomycine). Les cytokines ont été quantifiées par ELISA à partir des surnageants (n=3). * indique $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, et *** $p < 0,001$.

b) Une exposition au Kocide altère-t-elle la prolifération des lymphocytes T ?

Pour déterminer si une exposition au K3000 peut altérer la prolifération des LT, des cellules immunitaires issues des MLN ont été exposées pendant 72h à ce nanopesticide en présence d'un agent mitogène, la concanavaline A. Pour évaluer la prolifération des LT par cytométrie en flux, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD4, un marqueur de viabilité (Viability™) et un marqueur de prolifération (CellTrace®). L'impact d'une exposition au K2000 sur la prolifération des LT a également été évalué en suivant le même protocole. Aucune différence de prolifération des LT n'a été observée après exposition au K3000 et au K2000. Ces résultats suggèrent que les diminutions de production d'IL-6 et de TGF-β observées après exposition au K3000 et stimulation par CD3/CD28 ne sont pas dues à une altération de la prolifération des LT.

c) Quels types de cellules immunitaires sont impactés par une exposition au Kocide ?

Afin d'identifier les types cellulaires qui pourraient être impactés par l'exposition au K3000, une analyse par cytométrie en flux a été réalisée sur des cellules issues des MLN, exposées 48h à ce nanopesticide, avant stimulation par PMA/iono pendant 5h en présence d'un inhibiteur de transport protéique (Golgi Stop™) qui bloque la sécrétion des cytokines par les cellules immunitaires. Pour identifier les populations cellulaires, des marquages membranaires et intracellulaires spécifiques ont été réalisés. En parallèle, des cellules issues des MLN ont été exposées, dans les mêmes conditions, au K2000 afin de déterminer les effets nanospécifiques du K3000.

Aucune modification dans la proportion des cellules dendritiques (DC) (CD103⁺, CD11b⁺, CD64⁺, MHCII⁺, CD11c⁺), des lymphocytes T régulateurs (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺, IL-10⁺, TGF-β⁺) et des lymphocytes Th1 (CD3⁺, CD4⁺, T-bet⁺, IFN-γ⁺) n'a été observée après exposition des cellules issues des MLN au K3000 ou au K2000 (données non montrées). A la forte dose, les deux Kocides ont induit une diminution du pourcentage de cellules CD3⁻ CD4⁻ IFN-γ⁺, qui comprend des cellules Natural Killer (NK), des DC et des macrophages de type 1 (M1) (**Figure 3a**). Si aucune modification significative de la proportion des macrophages de type 2 (M2) (F4/80⁺ CD206⁺) n'a été observée après exposition au K2000, le traitement avec le K3000 induit une réduction de cette population aux doses de 0.025 et 0.25 µg/mL et suggère que cet effet pourrait être lié à la taille nanométrique des particules de Cu (**Figure 3b**). Ces résultats suggèrent qu'une exposition au K3000 pourraient induire, au niveau intestinal, une diminution de la proportion des cellules de l'immunité innée pro-inflammatoires mais aussi anti-inflammatoires comme les macrophages M2.

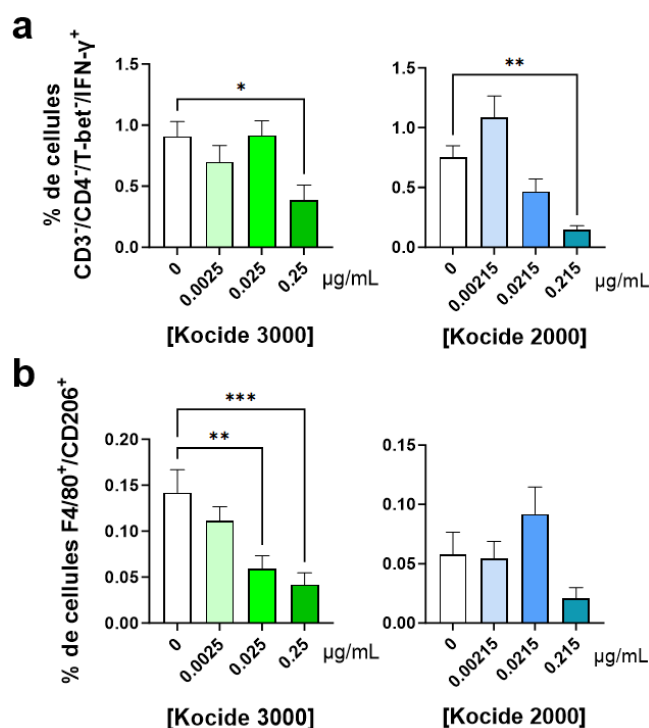


Figure 3. Impact d'une exposition au K3000 sur les proportions des cellules immunitaires des MLN. Les cellules immunitaires ont été isolées à partir des MLN de souris naïves (n=3) puis mises en culture et exposées au K3000 (0, 0.0025, 0.025, 0.25 μg/mL) ou au K2000 (0, 0.00215, 0.0215, 0.215 μg/mL) pendant 48h puis stimulées au mix PMA/ionomycine pendant 5h en présence d'un inhibiteur de transport protéique. La proportion des populations productrices d'IFN-γ hors Th1 (CD3⁺ CD4⁺ IFN-γ⁺) (a) et des macrophages M2 (F4/80⁺ CD206⁺) (b) a été évaluée par cytométrie en flux. *p* indique > 0,05 ; * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, et *** *p* < 0,001.

Discussion et perspectives

Les pesticides à base de Cu sous forme nanométrique, constituent une alternative aux pesticides conventionnels et sont déjà utilisés en agriculture conventionnelle et biologique hors UE. Après ingestion de ces NPs de Cu présentes sur les fruits et légumes contaminés par le nanopesticide, ces NPs pourraient être capable de passer la barrière intestinale et d'interagir avec les cellules immunitaires intestinales et systémiques. Ainsi, l'objectif de cette étude a été d'évaluer la réponse immunitaire intestinale et systémique suite à une exposition *ex vivo* à un nanopesticide à base de Cu, le Kocide 3000. Ces effets ont été comparés à ceux obtenus avec le Kocide 2000, un pesticide conventionnel à base de Cu (OH)₂, non « nanodimensionné » afin de déterminer les effets nanospécifiques du K3000.

Le Cu est un élément essentiel pour le bon fonctionnement de l'organisme et est nécessaire à plusieurs fonctions biochimiques vitales. Cependant, en excès, le Cu peut aussi s'avérer toxique pour les cellules, notamment via la production d'espèce réactives de l'oxygène ¹. Chez l'Homme, une exposition aiguë au Cu induit des troubles digestifs comme des nausées, des douleurs abdominales, des vomissements ou des diarrhées ². Malgré le potentiel effet délétère du K3000 sur l'homéostasie intestinale, très peu d'études ont évalué les conséquences sur des organismes non-cibles. Les données du fabricant indiquent une dose létale médiane (DL50) par voie orale chez le rat de 1847mg/kg pour

le K3000, et révèlent également qu'il est très toxique pour la vie aquatique avec une concentration létale 50 (CL50) de 0,24 mg/L chez la truite arc-en-ciel et une concentration efficace médiane (EC50) de 0,118mg/L chez la daphnie ³. Pour appuyer ces données, une étude montre qu'une exposition d'embryons et de larves de poissons zèbres au K3000 (2, 4 et 8 mg/L) pendant 72h induit des malformations et augmente l'expression de gènes de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et l'IL-8 ⁴. Dans notre étude, l'exposition des cellules des MLN à des doses non-cytotoxiques de K3000 a induit une diminution de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6. Cet effet a été également observé après exposition de ces cellules avec le K2000, suggérant que la diminution de l'IL-6 est potentiellement due à une substance présente dans les deux produits, sans effet de taille des particules de Cu. En accord avec nos résultats, la diminution de la sécrétion d'IL-6 a déjà été observée dans le plasma de rats nourris avec un régime supplémenté en NPs de cuivre ⁵. Une diminution de la production d'IL-6 a été montrée comme ayant des effets bénéfiques pour la santé, notamment la diminution du risque d'athérosclérose et un profil métabolique plus favorable (risque de diabète de type 2 et d'hyperglycémie diminué) ⁶. En revanche, l'IL-6 participant à de nombreuses fonctions dans la réaction immunitaire telles que le recrutement de cellules immunitaires lors d'une infection, une diminution excessive de cette cytokine pourrait diminuer ainsi les défenses immunitaires vis-à-vis de pathogènes et augmenter la susceptibilité de l'hôte à certaines infections ⁷. L'IL-6 favorise la différenciation des LT en cellules aux profils pro-inflammatoires comme les Th17 ou T cytotoxiques. En parallèle, elle inhibe également la différenciation des LT en Lymphocytes Treg aux capacités anti-inflammatoires ⁸. Cette différenciation est en partie médiée par la cytokine anti-inflammatoire TGF- β ⁹, dont la production par les cellules issues des MLN a également été diminuée après exposition au K3000. Cette réduction de la production de TGF- β par les cellules des MLN n'étant pas retrouvée après exposition au K2000, ces résultats suggèrent que cet effet pourrait être lié à la taille nanométrique des particules de Cu présentes dans le K3000. L'ensemble de ces résultats suggèrent également qu'une exposition au K3000 pourrait inhiber au niveau intestinal la différenciation des LT en Treg et, dans une moindre mesure, des LT en Th17 et T cytotoxiques *via* la diminution de la production d'IL-6 et de TGF- β par les cellules immunitaires des MLN. De manière surprenante, aucune altération de la prolifération des LT n'a été observée suite à l'exposition des cellules MLN au K3000. Toutefois, le marquage CD4 a permis d'évaluer la prolifération des lymphocytes totaux et il serait intéressant de réaliser un marquage spécifique de chaque population lymphocytaire pour déterminer si la prolifération des Th17 et des Treg a été ou non impactée par l'exposition à ce nanopesticide. Dans les MLN, le TGF- β et les cellules Treg sont des acteurs majeurs qui participent à l'induction de la tolérance orale^{10,11}. Les résultats de notre étude suggèrent donc qu'une exposition au K3000 pourrait altérer l'induction de la tolérance orale et ainsi favoriser le développement de sensibilité alimentaire telles que des allergies ou des intolérances ¹¹. Notre étude montre également

qu'une exposition des cellules MLN aux doses non-cytotoxiques de K3000 induit une diminution de la proportion des macrophages M2 et des cellules CD3⁻ CD4⁻ IFN- γ ⁺, qui comprennent des cellules NK, des DC et des macrophages M1¹². De plus, aucune altération du pourcentage de DC (CD103⁺, CD11b⁺, CD64⁺, MHCII⁺, CD11c⁺), de lymphocytes Treg (CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺, IL-10⁺, TGF- β ⁺) et de lymphocytes Th1 (CD3⁺, CD4⁺, T-bet⁺, IFN- γ ⁺) n'a été observée après exposition des cellules issues des MLN au K3000 ou au K2000. Ces résultats suggèrent qu'une exposition au K3000 pourrait induire, au niveau des MLN, une diminution du nombre de cellules immunitaires telles que les macrophages M2 et les cellules productrices d'IFN- γ . L'IL-6 est sécrétée par de nombreux types de cellules immunitaires notamment les macrophages, les DC et les LT¹³. De même, le TGF- β est produit par de multiples types cellulaires dont les DC⁹ et les macrophages de type 2 (M2)¹⁴. De plus, cette cytokine possède un rôle dans la polarisation des macrophages en un phénotype M2 *via* la protéine transmembranaire Neuropilin-1 (récepteur du TGF- β). Il a été démontré que le blocage de l'expression de la Neuropilin-1 empêche la polarisation des macrophages en M2¹⁵. Par conséquent, la réduction de la production de TGF- β par les cellules MLN suite à l'exposition au K3000 pourrait être due à une diminution des macrophages M2, ou inversement. Une étude supplémentaire axée sur les différents types cellulaires producteur(s) d'IL-6 et/ou de TGF- β permettrait de confirmer cette hypothèse.

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude montrent qu'une interaction directe du K3000 avec les cellules immunitaires des MLN induit une production diminuée d'IL-6 et de TGF- β pouvant être liée à une diminution du nombre de macrophages M2 et autres cellules de l'immunité innée. L'absence d'effet sur la proportion des macrophages et la production de TGF- β après exposition des cellules issues des MLN au K2000 suggère un impact nanospécifique du K3000 sur ces paramètres. De plus, l'exposition des cellules de la rate au K3000 n'a induit aucune modification de la production de cytokines et suggère que ce nanopesticide pourrait avoir des effets immunotoxiques spécifiquement au niveau intestinal. La production de TGF- β dans les MLN constitue une étape clé dans l'induction de la tolérance orale en bloquant une réponse inflammatoire excessive¹⁰. Une altération de l'induction de la tolérance est la première étape pour le développement d'allergies ou d'intolérances alimentaires¹⁶. Ainsi, nos données suggèrent qu'une exposition au K3000 pourrait favoriser le développement de ces pathologies en diminuant la production de TGF- β au niveau des MLN. Toutefois, les données de cette étude doivent être complétées par une analyse par cytométrie en flux plus approfondie afin d'identifier les populations immunitaires produisant du TGF- β et de l'IL-6 qui sont impactées suite à l'exposition au K3000. Enfin, nos résultats *ex vivo* doivent être confirmés dans un modèle *in vivo* pour évaluer les conséquences physiologiques induites par les effets immunotoxiques du K3000.

Références bibliographiques

1. Woźniak-Budych, M.J., Staszak, K., and Staszak, M. (2023). Copper and Copper-Based Nanoparticles in Medicine—Perspectives and Challenges. *Molecules* 28, 6687. <https://doi.org/10.3390/molecules28186687>.
2. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS) (2015). Scientific Opinion on re-evaluation of copper complexes of chlorophylls (E 141(i)) and chlorophyllins (E 141(ii)) as food additives. *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4151>.
3. Material Safety Data Sheet Kocide-3000 Dupont.pdf.
4. Aksakal, F.I., and Sisman, T. (2020). Developmental toxicity induced by Cu(OH)₂ nanopesticide in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol.* 35, 1289–1298. <https://doi.org/10.1002/tox.22993>.
5. Cholewińska, E., Juśkiewicz, J., and Ognik, K. (2018). Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the metabolic and immune status in a rat model. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 48, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.03.017>.
6. Georgakis, M.K., Malik, R., Li, X., Gill, D., Levin, M.G., Vy, H.M.T., Judy, R., Ritchie, M., Verma, S.S., Regeneron Genetics Center, et al. (2021). Genetically Downregulated Interleukin-6 Signaling Is Associated With a Favorable Cardiometabolic Profile: A Phenome-Wide Association Study. *Circulation* 143, 1177–1180. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052604>.
7. Guimarães, E.S., Martins, J.M., Gomes, M.T.R., Cerqueira, D.M., and Oliveira, S.C. (2020). Lack of Interleukin-6 Affects IFN- γ and TNF- α Production and Early In Vivo Control of *Brucella abortus* Infection. *Pathogens* 9, 1040. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121040>.
8. Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295–a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
9. Seeger, P., Musso, T., and Sozzani, S. (2015). The TGF- β superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 647–657. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.06.002>.
10. C. Faria, A., and Weiner, H. (2006). Oral Tolerance and TGF-beta-Producing Cells. *Inflamm. Allergy-Drug Targets* 5, 179–190. <https://doi.org/10.2174/187152806778256034>.
11. Issa, M., Rivière, G., Houdeau, E., and Adel-Patient, K. (2022). Perinatal exposure to foodborne inorganic nanoparticles: A role in the susceptibility to food allergy? *Front. Allergy* 3, 1067281. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.1067281>.
12. Darwich, L., Coma, G., Peña, R., Bellido, R., Blanco, E.J.J., Este, J.A., Borrás, F.E., Clotet, B., Ruiz, L., Rosell, A., et al. (2009). Secretion of interferon- γ by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology* 126, 386–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x>.
13. Diehl, S., and Rincón, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* 39, 531–536. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00210-9).

14. Song, G., Yang, R., Zhang, Q., Chen, L., Huang, D., Zeng, J., Yang, C., and Zhang, T. (2019). TGF- β Secretion by M2 Macrophages Induces Glial Scar Formation by Activating Astrocytes In Vitro. *J. Mol. Neurosci.* *69*, 324–332. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01361-5>.
15. Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., and Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* *877*, 173090. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>.
16. Shaikh, H., Vargas, J.G., Mokhtari, Z., Jarick, K.J., Ulbrich, M., Mosca, J.P., Viera, E.A., Graf, C., Le, D.-D., Heinze, K.G., et al. (2021). Mesenteric Lymph Node Transplantation in Mice to Study Immune Responses of the Gastrointestinal Tract. *Front. Immunol.* *12*, 689896. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689896>.

Gestion de projet

Le rétroplanning établi en début de stage prévoyait :

- 1) L'identification des doses non-cytotoxiques de Kocide 3000 et de Kocide 2000 sur les cellules immunitaires issues des MLN et des rates de souris naïves
- 2) L'évaluation des effets du Kocide 3000 et du Kocide 2000 sur la prolifération des LT des cellules immunitaires issues des MLN et des rates de souris naïves
- 3) L'évaluation des effets du Kocide 3000 et Kocide 2000 sur la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires issues des MLN et des rates de souris naïves
- 4) L'identification des types de cellules immunitaires impactés par le Kocide 3000 et Kocide 2000
- 5) L'évaluation chez la souris d'une exposition chronique au K3000 et K2000 sur la réponse immunitaire

Entre 3 et 6 semaines ont été accordées à chacune de ces expérimentations afin de palier à tout contretemps technique. En parallèle de celles-ci, il était prévu de réaliser des expérimentations pour une autre partie du projet : la partie qui s'articule sur des expériences *in vivo*, afin d'avancer au maximum l'obtention de résultats pour le projet global. De plus, un temps accordé à l'étude comparative des résultats *ex vivo/in vivo* était aussi prévu dans le planning initial. Cependant la dernière partie de mon projet, qui aurait permis de comparer mes résultats *ex vivo* avec ceux obtenus *in vivo* dans un modèle de souris exposées de façon chronique au Kocide, n'a pas pu être réalisée par faute de temps dû à des problèmes techniques.


En effet, lors de l'évaluation des effets des produits phytosanitaires sur la prolifération des LT, j'ai rencontré des soucis techniques sur un protocole d'expérimentation établi par le laboratoire auparavant. J'ai donc dû identifier la source du problème puis faire de la mise au point afin d'obtenir des résultats, ce qui a engendré du retard dans le planning initial. Ainsi, lors de ma première tentative pour évaluer les effets du Kocide sur la prolifération des lymphocytes, nous avons constaté une mort cellulaire très importante lors de l'analyse par cytométrie. Nous avons dans un premier temps pensé que cela pouvait être dû à un problème lors de l'isolement des cellules des MLN et de la rate. Dans la deuxième tentative, nous avons donc modifié la manière de procéder en isolant les cellules au fur et à mesure du prélèvement des organes pour limiter le temps passé dans la glace. De plus, les cellules ont également été fixées au paraformaldéhyde après marquage pour limiter la mortalité cellulaire due au temps de passage des échantillons au cytomètre en flux. Cependant, ces actions n'ont pas amélioré la viabilité cellulaire. Suite à cela, nous avons émis l'hypothèse que le problème pouvait venir du milieu de culture et/ou du temps de stimulation des cellules. Par conséquent, une optimisation du

protocole a été réalisée en testant plusieurs milieux de culture ainsi que différents temps de stimulation. Ainsi j'ai pu identifier le milieu de culture et le temps de stimulation adapté pour induire la prolifération des LT et identifier l'impact du Kocide sur ce paramètre. Pendant cette optimisation du protocole, j'ai quand même pu avancer sur les autres expérimentations puisque la plupart de ces dernières pouvaient être réalisées de manière indépendante. De plus, le temps dédié aux expérimentations *ex vivo* n'a pas été entièrement utilisé ce qui a permis de passer davantage de temps sur l'obtention de résultats pour les expériences *in vivo*.

Concrètement, le fait d'avoir prévu plus de temps que nécessaire pour chaque expérimentation afin de palier à un quelconque problème (manque de matériel spécifique à certaines expériences, problème de machines, échec de certaines expériences etc...), est ce qui m'a permis de rester fidèle au programme initial malgré cet imprévu. Toutefois, le retard accumulé des suites de ce contre-temps ne m'a pas permis de réaliser des expérimentations supplémentaires afin d'identifier précisément les types cellulaires produisant de l'IL-6 et/ou du TGF- β qui ont été impactés suite à l'exposition au Kocide 3000, ou d'autres populations impactées par une diminution de la production de ces cytokines comme les Th17.

Même si le planning initial m'a permis d'avoir une vision large sur le dérouler de mon stage, il était toutefois un peu ambitieux. Avec du recul, nous aurions pu réduire le temps accordé à l'obtention de résultats pour les expériences *in vivo* et se concentrer plus tôt sur la finalisation des résultats des expérimentations *ex vivo*, notamment concernant la prolifération des cellules immunitaires en présence de Kocide. Néanmoins, le fait d'avoir besoin d'animaux pour nos expériences allonge considérablement le temps nécessaire à la planification et reste le facteur limitant pour la gestion de ce projet, notamment lors d'imprévus. En effet, pour réaliser une expérience impliquant des animaux, il est nécessaire d'effectuer une demande au minimum un mois à l'avance, ce qui m'a empêché de réaliser les tests d'optimisation sur la prolifération plus tôt. Commander davantage de souris que nécessaire aurait probablement permis de ne pas perdre de temps face à une expérience n'ayant pas fonctionné, mais à cela s'oppose les principes éthiques des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) pour les animaux dédiés aux expérimentations.

A l'avenir, il faudrait prévoir davantage de temps, non seulement pour l'analyse en profondeur de mes résultats avant de passer à la tâche suivante, mais également pour la partie rédactionnelle liée au projet.

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Agroalimentaire Spécialisation / option : Biologie Moléculaire et Cellulaire Enseignant référent : Frédéric Lecerf
Auteur(s) : Sarah Dupont	Organisme d'accueil : Centre de recherche INRAE Centre Occitanie Toulouse
Date de naissance* : 08/05/2000	Adresse : 24 Chemin de Borde Rouge - Auzeville, F-31326 CASTANET TOLOSAN, France
Nb pages : 26 Annexe(s) : 0	
Année de soutenance : 2024	Maître de stage : Bruno Lamas
Titre français : Étude ex vivo de l'impact des nanopesticides de cuivre sur le système immunitaire systémique et intestinal	
Titre anglais : Ex Vivo study of the impact of copper nanopesticides on the systemic and intestinal immune system	
Résumé (1600 caractères maximum) : Le manque de données sur les nanopesticides à base de nanoparticules (NPs) de Cuivre (Cu) limite l'évaluation du risque lié à l'ingestion de végétaux contaminés par ces produits. La taille de ces NPs leur permettrait de passer la barrière intestinale et interagir avec les cellules immunitaires de l'intestin. Cette étude évalue ex vivo l'impact du Kocide 3000 (K3000) nanoformulé, comparé au Kocide 2000 (K2000) conventionnel, sur la réponse immunitaire. Pour cela, les cellules immunitaires des MLN et des rates de souris naïves ont été isolées puis exposées ex vivo au K3000 ou K2000. L'impact de ces substances sur la production de cytokines, la prolifération et la différenciation de ces cellules a été évalué. L'exposition des cellules des MLN au K3000 et au K2000 induit une diminution de la production d'IL-6. Cependant, contrairement au K2000, seule une exposition au K3000 réduit la sécrétion de TGF- β ainsi que la fréquence des macrophages M2, suggérant un effet spécifique à la taille nanométrique des particules. En conclusion, nos résultats montrent qu'une exposition des cellules immunitaires des MLN au K3000 induit une réduction de la production d'IL-6/TGF- β pouvant être liée à la diminution de populations immunitaires, ce qui pourrait ainsi favoriser l'apparition de sensibilités alimentaires.	
Abstract (1600 caractères maximum) : The lack of data on copper (Cu) nanoparticles (NPs) based nanopesticides limits the assessment of the risk associated with the ingestion of plants contaminated by these products. The size of these NPs would allow them to pass the intestinal barrier and interact with immune cells in the intestine. This study evaluates ex vivo the impact of nanoformulated Kocide 3000 (K3000), compared to conventional Kocide 2000 (K2000), on the immune response. To do this, immune cells from MLNs and spleens of naïve mice were isolated and then exposed ex vivo to K3000 or K2000. The impact of these substances on cytokine production, proliferation and differentiation of these cells was evaluated. Exposure of MLN cells to K3000 and K2000 induced a decrease in IL-6 production. However, unlike K2000, only exposure to K3000 reduced TGF- β secretion and M2 macrophage frequency, suggesting a nano-size-specific effect. In conclusion, our results show that exposure of MLN immune cells to K3000 induces a reduction in IL-6/TGF- β production that may be related to the decrease in immune populations, which could thus promote the onset of food sensitivities.	
Mots-clés : Nanopesticides de cuivre, Kocide 3000, système immunitaire, toxicité	
Key Words: Copper nanopesticides, Kocide 3000, immune system, toxicity	

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires