



HAL
open science

Étude de la microglie dans un modèle d'intoxication à un organophosphoré induisant des crises d'épilepsie

Julie Somkhit

► **To cite this version:**

Julie Somkhit. Étude de la microglie dans un modèle d'intoxication à un organophosphoré induisant des crises d'épilepsie. Neurobiologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP7323 . tel-04106677

HAL Id: tel-04106677

<https://theses.hal.science/tel-04106677>

Submitted on 25 May 2023

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.

Université de Paris
Ecole doctorale BioSPC – ED562
Inserm, UMR 1141

Étude de la microglie dans un modèle d'intoxication à un organophosphoré induisant des crises d'épilepsie

Par Julie SOMKHIT

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par Nadia SOUSSI-YANICOSTAS

Présentée et soutenue publiquement le 20 Octobre 2021

Devant un jury composé de :

DESDOUETS Chantal	DR	Université de Paris	Présidente du jury
BABIN Patrick	PU	Université de Bordeaux	Rapporteur
RASSENDREN François	DR	Université de Montpellier	Rapporteur
CALAS Guilhem	PhD	IRBA	Examineur
CHLUBA Johanna	PU	Université de Bourgogne	Examinatrice
SCHMIDT Anne	CR-HDR	Institut Pasteur	Examinatrice
SOUSSI-YANICOSTAS Nadia	DR	Université de Paris	Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this is work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

CE TRAVAIL A ÉTÉ FINANCÉ PAR
UNE BOURSE ATTRIBUÉE PAR
L'AGENCE INNOVATION DÉFENSE,
AINSI QUE PAR L'INSERM



**AGENCE
INNOVATION
DÉFENSE**

IL S'EST DÉROULÉ AU SEIN DE
L'UNITÉ U1141, NEURODIDEROT.

HÔPITAL ROBERT DEBRÉ
INSERM U1141 – BÂTIMENT ÉCRAN
48 BOULEVARD SÉRURIER
75019 PARIS



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

NEURODIDEROT

Unité Mixte de Recherche UMR 1141
Inserm – Université de Paris

Étude de la microglie dans un modèle d'intoxication à un organophosphoré induisant des crises d'épilepsie

Résumé

Les organophosphorés (OPs) sont des composés organiques qui inhibent l'acétylcholinestérase (AChE). Cette enzyme est essentielle pour mettre fin à la transmission synaptique au niveau des jonctions neuro-musculaires, et entre les neurones cérébraux au niveau des synapses cholinergiques. L'inhibition de l'AChE par les OPs peut causer une multitude de symptômes périphériques et centraux, qui peuvent notamment se traduire par des paralysies, des atteintes pulmonaires, des convulsions ou des crises d'épilepsie. Si ces crises ne sont pas rapidement traitées, elles peuvent s'aggraver et aboutir à un état de mal épileptique, plus difficile à traiter. De plus, la dégradation du complexe AChE-OP rend la réactivation de l'enzyme impossible. Ainsi, de par leur utilisation largement généralisée en tant que pesticides mais aussi comme armes chimiques lors d'attaques terroristes par exemple, et des difficultés à traiter les conséquences d'une intoxication, les OPs représentent un réel danger de santé publique. Il apparaît donc essentiel de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer le traitement des intoxications chroniques et aiguës aux OPs.

Les cellules microgliales, macrophages résidents du cerveau, ont longtemps été considérées comme de simples macrophages. Cependant, les études de ces dernières décennies ont permis de mettre en lumière leurs fonctions bien plus diverses et essentielles que ce qu'il était initialement pensé. Ainsi, il apparaît aujourd'hui que la microglie est indispensable au développement et à la maturation du cerveau, et remplit des fonctions variées tout au long de la vie d'un individu. Des études suggèrent d'ailleurs que ces cellules auraient un rôle dans le déclenchement et l'aggravation de crises d'épilepsie.

Le but de ma thèse était d'étudier les cellules microgliales dans un contexte d'intoxication à un OP, afin de mieux comprendre les mécanismes microgliaux mis en jeu suite à cette intoxication et ainsi de trouver de nouvelles voies thérapeutiques. Dans un premier temps, ce travail de thèse a permis de mettre au point un modèle d'intoxication à un OP, le diisopropylfluorophosphate (DFP), utilisant le poisson zèbre. Ce modèle reproduit les caractéristiques principales d'une intoxication aux OPs, déjà observées dans différents modèles de rongeurs, comme par exemple la paralysie ou l'apparition de crises épileptiformes. Dans un second temps, j'ai caractérisé le comportement de la microglie dans ce modèle. J'ai pu observer et quantifier les changements morphologiques et dynamiques de ces cellules. Ces modifications indiquent leur activation, qui fut confirmée par la quantification d'une forte augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau des larves intoxiquées au DFP.

L'ensemble de ce travail contribue à une meilleure compréhension des conséquences neurologiques d'une intoxication à un OP, et ouvre des perspectives de découverte de nouveaux traitements, qui pourraient pallier le manque actuel.

Mots clés : organophosphorés, diisopropylfluorophosphate, intoxication, microglie, poisson zèbre, neuroinflammation, imagerie calcique, imagerie *in vivo*, crise d'épilepsie

Study of microglia in a model of organophosphorus poisoning inducing seizure activity

Abstract

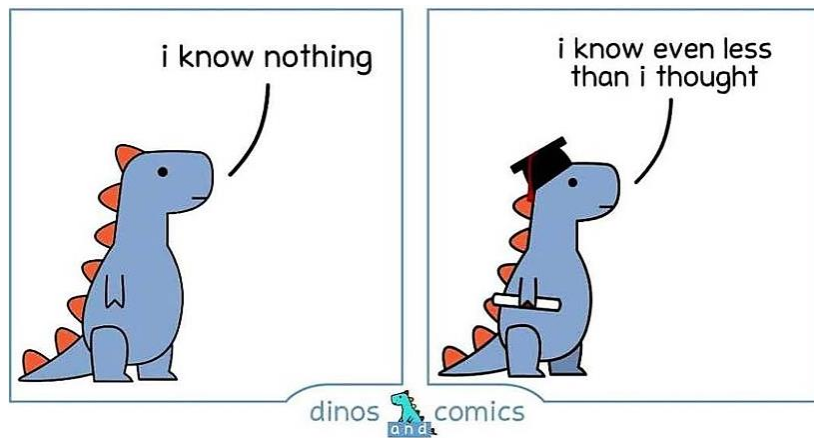
Organophosphorus compounds (OPs) are organic compounds that inhibit acetylcholinesterase (AChE). This enzyme is essential to terminate neuronal transmission at neuromuscular junctions or at cholinergic synapses. Inhibition of AChE by OPs can cause many peripheral and central symptoms, which can manifest as paralysis, pulmonary damage, convulsions or seizures. If the seizures are not rapidly treated, they can worsen in status epilepticus, which is more difficult to treat. Moreover, aging of the AChE-OP adduct makes it impossible for the enzyme to be reactivated. Thus, because OPs are widely used as pesticides but also as chemical warfare agents, and because intoxication consequences are very hard to treat, OPs represent a real threat to public health. It thus appears essential to find new therapeutic targets to improve treatment of chronic and acute OP poisoning.

Microglial cells, resident macrophages of the brain, have long been considered as just macrophages. However, research of the past decades have shed to light their many other functions, more diverse and essential than it was initially thought. It appears now that microglia is vital to brain development and maturation, and fulfills multiple roles throughout one's life. Incidentally, some studies suggest that these cells have a role in triggering and worsening seizures.

The goal of my PhD was to study microglia following OP poisoning, in order to better understand the microglial mechanisms at play when exposed to OPs, and to find new therapeutic approaches. First, I helped develop a zebrafish model of OP poisoning, using diisopropylfluorophosphate (DFP). This model reproduces main characteristics of OP poisoning, already observed in existing rodent models, such as paralysis or development of seizures. Then, I characterized the behavior of microglial cells in this model. I observed and quantified morphological and dynamic changes underlying their activation, which was confirmed by the quantification of a massive increase of pro-inflammatory cytokine expression in the brain of poisoned larvae.

Overall, this work contributes to a better understanding of OP poisoning neurological consequences, and opens perspectives on finding new innovative treatments that could alleviate the current need.

Keywords: organophosphorus, diisopropylfluorophosphate, poisoning, microglia, zebrafish, neuroinflammation, calcium imaging, *in vivo* imaging, seizure



《 学然后知不足 》

"To learn is to know one's ignorance" – Book of rites 礼经

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Patrick Babin et le Dr François Rassendren d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ma thèse, mais aussi le Pr Johanna Chluba et le Dr Anne Schmidt d'avoir accepté d'examiner ma thèse. Merci au Dr Guilhem Calas d'être également examinateur de ma thèse mais aussi d'avoir accepté de prendre le relais en tant que tuteur DGA, pour nos échanges scientifiques et son soutien. Je remercie le Dr Chantal Desdouets, présidente de mon jury de thèse, pour son aide et pour tout le temps qu'elle m'a accordé. Je remercie la Direction Générale de l'Armement (DGA) et l'Inserm, qui m'ont accordé une bourse me permettant de réaliser ma thèse.

Je souhaite ensuite remercier le Dr Nadia Soussi-Yanicostas de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son équipe et de découvrir ce magnifique modèle qu'est le poisson zèbre. Merci à Constantin Yanicostas pour toutes les discussions, scientifiques ou non, toujours intéressantes. Merci à Monsieur Olivier Bar, pour toutes les crises de rires que tu as provoquées, intentionnellement ou non. Ces moments de légèreté étaient plus qu'appréciés et nécessaires. Merci à Viviane Romain pour tous ces moments passés à papoter et tous ces litres de planteur réalisés à la perfection. J'ai particulièrement apprécié qu'on puisse parler de tout ensemble. Merci à vous 2 d'avoir maintenu en vie ces précieux petits poissons, essentiels à ma thèse.

Merci à tous les anciens membres de l'équipe, anciens stagiaires et anciens thésards. Je pense notamment à Thivya Jeyaranjan et Gavshalya Ravichandran avec qui j'ai commencé cette aventure, Salima Brouri, Eliana El Dawra, Myriem Hadi, Joan Floridor, Léna Cattai et Noémie Chen, petite rebelle efficace mais qui ne veut jamais partir à l'heure. Et merci à la dernière petite fournée de stagiaires, mais pas des moindres ! Merci Michaël Kemogni pour ton sel qui nous a bien fait rire, à Paul Nazac, pour tes mouvements de danse déchaînés, et à Florence Uriac pour nos crises de larmes et de rires partagées. Quand on y pense, c'est déjà pas mal d'avoir un neurone, pour une pomme ... Un grand merci à Rahma Hassan-Abdi, qui était comme une grande sœur pendant le peu de temps qu'on a eu ensemble. Merci pour les fous rires sur tes réflexions à tendances psychopathes et pour tout le savoir que tu m'as transmis avec une pédagogie incroyable. Tu as ça dans le sang et j'espère sincèrement que tu continueras. Un gigantesque merci, évidemment, à Alexandre Brenet. Tu disais que j'ai été ton acolyte, ton souffre-douleur. Et bien je pense que je peux te retourner le compliment. Merci de m'avoir appris presque tout ce que je sais faire aujourd'hui en termes de manips, merci pour ton aide à la réflexion scientifique et pour toutes les fois où tu m'as aidée, que ce soit encore une fois pour les manips, ou pour les analyses, les week-ends au labo, etc. Merci de m'avoir supportée, je concède que ça n'a pas dû être de tout repos, et désolée pour tous ces majeurs brandis (mais bon, des fois tu cherches aussi !). On en aura vécu des choses ! Et on se sera bien serré les coudes. Merci pour tout, vraiment.

Je souhaite aussi remercier tous les membres de l'unité 1141 de l'Inserm, qui m'ont aidée et soutenue, de près ou de loin pendant ces 3 dernières années. Merci à tous pour votre accueil. Merci notamment au Dr Pierre Gressens, pour tout le temps qu'il m'a accordé, surtout sur la

fin. Ton aide a été très précieuse et je t'en suis très reconnaissante. Merci également à Cindy Bokobza, pour son aide quand j'étais un peu perdue pour l'écriture de ce mémoire. Tu m'as aidée à me recentrer et ça m'a redonné confiance en moi et mon travail. Merci à Marisol Corral pour toutes ces heures passées à discuter de tout et de rien, pour ses nombreux conseils et remarques toujours avisés. Merci à Sophie Lebon, Grande Manitou de la BM, d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions, mais aussi pour ses délicieux desserts lors des repas de l'unité. Merci à Kheira Abdelmoumene pour son côté maman poule et pour tous les coups de main administratifs, qu'est-ce qu'on ferait sans toi ? Merci à Nina Dupuis, ma tutrice DGA initiale, pour sa grande gentillesse et pour m'avoir initiée à la BM. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, même si cela fut bref. Merci également à l'équipe des Mitologics, avec qui j'ai réalisé une partie de ce travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous tous, merci d'avoir pris le temps de m'expliquer les choses et de m'avoir accueillie dans vos labos pour les manips, l'accueil était toujours au top.

Je n'oublie évidemment pas ceux avec qui j'ai passé le plus de temps à ne pas travailler (en dehors des horaires de travail, bien entendu ...). Merci à Éléonore Sizun et Alexandra Albert, toujours les premières arrivées au QG, où on a passé une bonne partie de notre temps. Amazigh Mokhtari, merci pour ton humour décalé et ta répartie presque sans faille ! Qu'est-ce qu'on en aura dit des conneries (mais surtout toi) ... Merci à Victoria Jean-Baptiste Sérichard, la dernière addition au groupe et talentueuse crochet-iste, dommage que tu ne sois pas arrivée plus tôt ! Et un très grand merci à mes deux piliers, à plein de niveaux différents. Merci, Amélia Madani, ma cous cousine préférée, et Maud Ringot, la plus *époustouflante*. Merci pour toutes les pauses gâteaux et les pauses potins, merci pour votre soutien et votre amitié indéfectible. Merci à tous ceux qui m'ont suivie dans ma folie d'un voyage au ski, ce *fameux* voyage au ski. On se souviendra des (nombreuses) gamelles d'Alexandre, de la descente d'une piste sur les fesses par Amélia, de la classe que Maud avait à chaque mouvement sur ses skis, des cris stridents et injustifiés sur la luge sur rails, des gamelles au ralenti dans les descentes en luge classique, sans oublier notre chance incroyable d'avoir pu profiter de ce séjour avant l'annonce du confinement.

J'en viens maintenant à mes amis de plus longue date, notamment mes amis d'école d'ingénieur. Merci à Natsuko Ueda, Gauthier Jardon, et *évidemment* Anaïs Basset, le groupe d'enfer. Merci pour ces années qui en valaient clairement le coup grâce à vous. On aura bien profité de notre dernière année (même un peu trop ?). Natsuko, maintenant que j'ai un peu plus de temps, je vais tout faire pour venir te voir, comme je te l'avais promis depuis qu'on a commencé la thèse ! Gauthier, *you're next*. Et Anaïs, on va pouvoir reprendre la semaine annuelle en Bretagne ! Merci à Camille Roiron, alias la chenille, pour avoir été une binôme de TP incroyable, on se revoit vite aussi ! Merci aux Jacks pour cette belle campagne. On n'a pas gagné mais on n'a pas fait le ménage, et c'est peut-être pas si mal. Merci à Kaiwei Wang de remplir mes quotas d'amis chinois, ton amitié est rafraîchissante. J'attends avec impatience notre prochaine fondue chinoise. Merci à mes amis de prépa, Timotée Sohet, Sébastien Fournier, Alix Ferrandeau, Julie Saint-Germain, Hanaé Dupont, Alexandre Traboulsy, et tous les autres. Merci d'avoir rendu ces années aussi fun alors qu'elles étaient censées être difficiles. J'en garde un super souvenir. Et enfin, merci à mon amie de plus grande date, Elsa Mikaelian.

On a eu nos hauts et nos bas, mais c'est ce qui a rendu notre amitié si forte. 20 ans qu'on se supporte, *here's to the next 20 years and many more.*

Un grand GRAND merci à mon Hugo. Nos chemins se sont croisés à de nombreuses reprises et on s'est visiblement ratés à chaque fois mais on a fini par se trouver. Merci d'être aussi gentil, merci pour tous tes petits plats, tes petites attentions et ton amour. Merci de me supporter au quotidien. Merci d'être là, tout simplement ♡

Enfin, il est impossible de ne pas remercier ma famille, sans qui je ne serais évidemment pas arrivée jusqu'ici. Merci à mes nombreux oncles, tantes, cousins et cousines pour leur soutien. Merci Mély d'avoir été une grande sœur autoritaire (tu peux arrêter maintenant), et d'avoir été mon modèle à suivre (quand on était petites je précise, on sait jamais). Merci Willy pour les pauses jeux pendant le week-end, et bravo de supporter tes 2 grandes sœurs, je sais que c'est pas facile tous les jours ... Et le plus important pour la fin. Un simple « merci » ne suffira jamais assez pour exprimer toute la gratitude que j'ai pour mes parents, qui ont travaillé dur pour nous donner tous les moyens de réussir.

感谢我的爸爸妈妈，你们是任何一个孩子可以希望拥有的最好的父母：对我们解决生活学习和工作上地难题竭尽全力地帮助，在我们身边长久执着的陪伴，对我们毫无保留的支持。你们让我一直以来感到如此地快乐，我希望我能一样让你们感到骄傲。无尽的感恩之情，爱与祝福我们并不需要常常挂在嘴边也能知道，但这次我想要大声地说：爸爸妈妈，非常感谢你所做的一切，我全心全意地爱你们。

Abréviations

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADNc	ADN complémentaire
ARNm	ARN messenger
BChE	Butyrylcholinestérase
DAMP	Damage-associated molecular pattern
BHE	Barrière hémato-encéphalique
DFP	Diisopropylfluorophosphate
E/I	Excitation/inhibition
EMP	Erythromyeloid progenitor
FW	Fish water, eau de poisson
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GABA_AR	Récepteur GABA de type A
hpf	Heures post-fécondation
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
IL	Interleukin
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
jpf	Jours post-fécondation ou post-fécondation
KO	Knock-out
LD₅₀	Lethal dose 50%
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPS	Lipopolysaccharide
mAChR	Muscarinic acetylcholine receptor
MO	Morpholino-oligonucléotide
MTZ	Métronidazole
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor
nM	Nanomolaire (nmol/L)

NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NOP	Neurotoxic organophosphorus
NO	Oxyde nitrique
NPC	Neural progenitor cell
NTE	Neuropathy target esterase
NTR	Nitroréductase
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PLM	Mésoderme latéral postérieur
PTU	Phénylthiourée
OMS	Organisation mondiale de la santé
OP	Organophosphoré
OPC	Oligodendrocyte progenitor cell
OPP	Organophosphoré pesticide
RBI	Rostral blood island (îlot sanguin rostral)
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription, transcription inverse
SNC	Système nerveux central
TGF	Transforming growth factor
TS-GWD	Teleost-specific whole genome duplication
VDA	Ventral wall of dorsal aorta
WGD	Whole genome duplication

Sommaire

RÉSUMÉ.....	4
ABSTRACT	5
REMERCIEMENTS	8
ABRÉVIATIONS	12
SOMMAIRE	14
AVANT-PROPOS	18
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	19
I. LES ORGANOPHOSPHORÉS	20
1.1. Généralités chimiques et historiques.....	20
1.2. Toxicologie.....	21
1.3. Utilisations.....	22
1.3.1. Les pesticides	22
1.3.2. Les agents de guerre.....	23
1.4. Mécanisme d'action	23
1.5. Traitements actuels.....	26
1.5.1. L'atropine.....	27
1.5.2. Les oximes	27
1.5.3. Les benzodiazépines	29
1.6. Le diisopropylfluorophosphate (DFP).....	30
II. L'ÉPILEPSIE ET LES CRISES D'ÉPILEPSIE	30
2.1. Définitions	31
2.2. Les crises d'épilepsie.....	31
2.3. Facteurs de risque.....	33
2.3.1. Prédispositions génétiques	33
2.3.2. Équilibres ioniques et balance synaptique excitation/inhibition.....	34
2.3.3. Antécédents d'atteintes cérébrales	34
2.3.4. L'inflammation	35
III. LA MICROGLIE.....	37
3.1. Historique	37
3.2. Description	38

3.3.	Quelques facteurs impliqués dans le développement de la microglie.....	39
3.3.1.	CX3CL1 ou fractalkine.....	39
3.3.2.	Runx1.....	40
3.3.3.	PU.1.....	41
3.3.4.	CSF1R.....	41
3.4.	La microglie pendant le développement et en conditions physiologiques.....	42
3.5.	La microglie en conditions pathologiques.....	44
3.6.	La microglie dans l'épilepsie.....	47
IV.	LE POISSON ZÈBRE.....	48
4.1.	Généralités.....	48
4.2.	Développement général du poisson zèbre.....	49
4.3.	Développement cérébral et colonisations microgliales.....	51
4.3.1.	Première vague : la microglie embryonnaire.....	52
4.3.2.	Deuxième vague : la microglie définitive.....	55
4.4.	Un modèle animal de choix.....	56
4.5.	Intérêt pour cette étude.....	59
4.6.	Limitations du modèle animal.....	60
	OBJECTIFS.....	61
	CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	63
I.	ÉLEVAGE DES POISSONS ZÈBRE.....	64
1.1.	Conditions d'élevage.....	64
1.2.	Reproduction.....	64
1.3.	Lignées utilisées.....	65
II.	ABLATION DE LA MICROGLIE PAR MICROINJECTION DE MORPHOLINO.....	65
III.	TRAITEMENT AU DFP.....	66
IV.	IMAGERIE <i>IN VIVO</i>	66
4.1.	Visualisation de la microglie.....	67
4.2.	Activité calcique neuronale.....	68
V.	ÉTUDE DE L'INFLAMMATION ET DE L'ACTIVITÉ NEURONALE PAR RT-QPCR.....	69
5.1.	Obtention des échantillons.....	69
5.1.1.	Inflammation globale et activité neuronale.....	69
5.1.2.	Neuroinflammation.....	70
5.2.	Extraction d'ARN et dosage.....	70

5.3. Vérification de la qualité de l'ARN	70
5.4. Transcription inverse (RT)	71
5.5. PCR quantitative (qPCR)	71
VI. STATISTIQUES.....	72
CHAPITRE 3 : ÉTABLISSEMENT DU MODÈLE	73
PARTIE I : DÉFAUTS COMPORTEMENTAUX, HYPEREXCITATION NEURONALE ET MORT CELLULAIRE CÉRÉBRALE	74
Résumé de l'article	74
Résumé graphique de l'article	75
Article	76
PARTIE II : DÉFAUTS RESPIRATOIRES	93
Résumé de l'article technique.....	93
Article technique.....	94
Résultats (non publiés).....	98
Discussion et perspectives	99
CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE LA MICROGLIE	101
INTRODUCTION	102
RÉSULTATS.....	102
Les cellules microgliales changent de morphologie après exposition au DFP.....	102
Les cellules microgliales sont plus mobiles après exposition au DFP.....	105
L'exposition au DFP induit une inflammation importante	106
RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES	109
Neuroinflammation	109
Conséquences de l'ablation de la microglie sur le profil inflammatoire	110
Conséquences de l'ablation de la microglie sur l'activité neuronale.....	114
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	117
TRAITEMENTS AU DMSO ET AU DFP	118
ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ NEURONALE PAR IMAGERIE CALCIQUE.....	119
ÉTUDE <i>IN VIVO</i> DE LA MICROGLIE ET DE SA DYNAMIQUE PAR IMAGERIE	120
LA MICROGLIE ET L'INFLAMMATION : BÉNÉFIQUES OU NÉFASTES ?.....	121
L'ABLATION DE LA MICROGLIE	123
TRAITEMENTS.....	127

CONCLUSION GÉNÉRALE	131
ANNEXES	133
AVANT-PROPOS	134
ARTICLE : “DEFECTIVE EXCITATORY/INHIBITORY SYNAPTIC BALANCE AND INCREASED NEURON APOPTOSIS IN A ZEBRAFISH MODEL OF DRAVET SYNDROME”	135
BIBLIOGRAPHIE	148
TABLE DES TABLEAUX.....	170
TABLE DES FIGURES.....	171

Avant-propos

Les organophosphorés (OP) sont des composés organiques utilisés notamment dans les pesticides, mais aussi en tant qu'armes chimiques. Ainsi, ils représentent un danger pour la population militaire, mais aussi pour la population civile en cas d'attaque terroriste par exemple, ou dans le cas d'utilisation de pesticides, avec des expositions répétées, même à faibles doses. En effet, l'intoxication aux OP peut engendrer de nombreux symptômes comme une paralysie, une détresse respiratoire ou des crises d'épilepsie, qui peuvent conduire jusqu'à la mort. Les traitements actuels contre l'intoxication aiguë sont efficaces s'ils sont administrés rapidement, mais il n'est pas toujours possible de le faire. C'est pourquoi la recherche s'intéresse à de nouvelles voies thérapeutiques qui seraient efficaces même si les traitements sont administrés plus tardivement. Parmi elles, la microglie, les macrophages résidents du cerveau, attire l'attention des chercheurs. Cette dernière aurait en effet un rôle dans le déclenchement et l'aggravation des crises d'épilepsie.

Pour étudier la microglie dans le contexte d'une intoxication à un OP, ici le diisopropylfluorophosphate (DFP), j'ai utilisé le modèle du poisson zèbre. L'introduction de ce mémoire se concentre donc autour de 4 axes principaux :

1. Les organophosphorés
2. L'épilepsie et les crises d'épilepsie
3. La microglie
4. Le poisson zèbre

Chapitre 1 :

Introduction

I. Les organophosphorés

1.1. Généralités chimiques et historiques

Les organophosphorés (OP) sont une classe de molécules organiques contenant au moins un atome de phosphore. L'atome de phosphore peut être trivalent ou pentavalent, c'est-à-dire qu'il peut être capable de former 3 ou 5 liaisons covalentes avec d'autres atomes. Parmi les principales catégories d'organophosphorés, on trouve les esters de phosphate, ayant un phosphore pentavalent et une structure générale $P(=O)(OR)_3$ ou $P(=S)(OR)_3$, ou encore les phosphonates, de formule générale $RP(=O)(OR')_2$, où R et R' peuvent être des groupes alkyles ou aryles, un halogène comme le fluor (F), un groupement cyanure (CN) ou encore un groupe S-alkyle (**Figure 1**). Ces catégories d'OP possèdent des propriétés neurotoxiques.

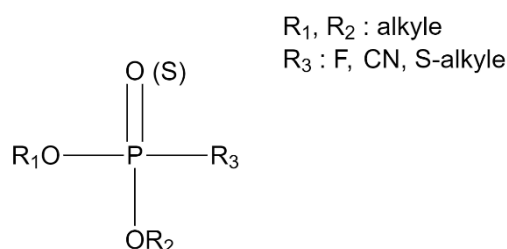


Figure 1 : structure générale des OP

Les organophosphorés font leur toute première apparition dès la fin des années 1830 (Petroianu 2009). Ils émergent réellement dans les années 1930, lorsqu'ils sont synthétisés par un chimiste, Gerhard Schrader, travaillant alors pour le compte d'une entreprise allemande fabriquant des insecticides. Ce dernier et son équipe synthétisent alors des centaines d'OP et attirent l'attention du gouvernement allemand, à l'époque sous l'influence des Nazis, qui lui demande de développer des composés de forte toxicité et haute volatilité afin de les utiliser comme gaz de combat. Au total, près de 2 000 OP ont été synthétisés dont le parathion, qui a largement été utilisé comme insecticide, mais aussi le diisopropylfluorophosphate (DFP), aujourd'hui largement utilisé comme un modèle OP (Sogorb, Estevez, and Vilanova 2015), le sarin, le tabun ou encore le soman, des OP connus pour avoir été utilisés plus tard comme agents de guerre (Soltaninejad and Shadnia 2014). Ces trois derniers composés font partie de la série G, pour *German* : GA pour le tabun, GB pour le sarin, GD pour le soman (**Figure 2**). En parallèle, des scientifiques britanniques travaillaient également sur la synthèse des OP et ont développé la série V, bien plus puissante que la série G. Parmi les composés de cette série, on

retrouve notamment le VX, 10 fois plus toxique que le sarin (concentration létale de 10 mg·min/m³ lorsqu'aérosolisé, contre 100 mg·min/m³ pour le sarin).

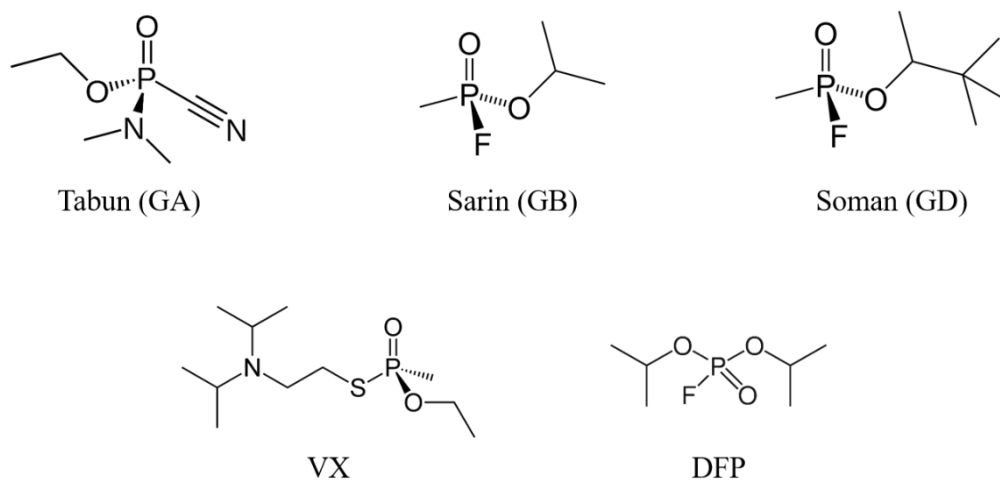


Figure 2 : structure de différents organophosphorés

1.2. Toxicologie

Les OP sont des composés très lipophiles. Cette propriété leur permet de franchir aisément les différentes barrières biologiques : ils pénètrent dans la circulation sanguine par la peau, les yeux, ou par les voies aériennes. Une fois dans la circulation sanguine, ils peuvent facilement passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) car ils sont à la fois très lipophiles et de faible poids moléculaire (inférieur à 300 g/mol) (Buffat et al., 1989). Ces propriétés rendent donc les OP très dangereux. En effet, la dose nécessaire pour tuer 50% d'une population exposée (LD₅₀) à un OP est de l'ordre du gramme, voire même du milligramme pour le soman et le VX, dont les constantes d'inhibition de l'acétylcholinestérase humaine, une enzyme affectée par les OP, sont 3 à 5 fois plus importantes que celle du sarin (Tableau 1).

Propriétés	Tabun (GA)	Sarin (GB)	Soman (GD)	VX	DFP
Poids moléculaire (g/mol)	162,1	140,1	182,2	267,4	184,1
Vapeur : LC _{t50} (mg × min/m ³)	400	100	50	10	n.a.
Liquide : LD ₅₀ (absorption par la peau pour un homme de 70 kg)	1,0 g	1,7 g	350 mg	10 mg	n.a.
k_i × 10 ⁵ M ⁻¹ ·min ⁻¹	182 ^(a)	398 ^(a)	1930 ^(a)	1150 ^(a)	1,3 ^(b)

Tableau 1 : résumé de différentes propriétés physicochimiques du tabun, du sarin, du soman, du VX et du DFP

LC₅₀, exposition à de la vapeur ou un aérosol causant la mort de 50% de la population exposée ;
LD₅₀, dose nécessaire pour causer la mort de 50% de la population exposée par contact cutané ;
 k_i , constante de vitesse d'inhibition. Plus le k_i est grand, plus le potentiel inhibiteur de l'OP est important. n.a., valeur manquante

Sources :

- > poids moléculaires : Sigma Aldrich
- > LC₅₀ et LD₅₀ : Newmark (2009)
- > k_i : (a) Worek, Thiermann and Wille (2020)
(b) Moyer *et al.* (2018)

1.3. Utilisations

La découverte et l'émergence des OP dans les années 1930 est liée à une volonté de mettre sous contrôle les insectes vecteurs de maladies pour les plantes agricoles destinées à la consommation, mais aussi les infestations d'insectes dans les bâtiments publics et domestiques (Minton and Murray 1988). Ce n'est qu'un peu plus tard, dans les années 1980, qu'ils sont utilisés de façon certaine à des fins militaires (Delfino, Ribeiro, and Figueroa-Villar 2009).

1.3.1. Les pesticides

Dans les années 1970, les pesticides de l'époque, majoritairement des organochlorés, se voient interdits de commercialisation en raison de leur persistance dans l'environnement et de leurs effets néfastes sur la santé humaine (Karasali and Maragou 2016). C'est à cette période que les organophosphorés deviennent particulièrement populaires en tant que pesticides. Leur très grande efficacité leur permet de s'imposer sur ce marché. Ainsi, en 2000 aux États-Unis, ils représentaient 71% des pesticides utilisés. Cependant, comme pour les organochlorés, leur toxicité envers les humains et d'autres espèces non ciblées a amené les autorités sanitaires à mettre en place des restrictions réglementaires, abaissant à 33% la quantité d'OP pesticides (OPP) utilisés en 2012 aux États-Unis (Atwood and Paisley-Jones 2017). Cette utilisation massive des OPP est un problème environnemental de plus en plus reconnu, comme le montrent de nombreuses études sur les effets délétères sur la santé des enfants et des adultes, et ce, même sur des populations dont l'exposition n'est pas liée à leur profession (Bouchard et al. 2010; Reiss et al. 2015; Rohlman, Anger, and Lein 2011).

En plus des conséquences accidentelles de l'utilisation d'OPP, ces derniers sont impliqués dans de nombreux cas d'empoisonnement volontaires. Cette méthode de tentative de suicide est une des plus communes dans les pays en développement, et plus particulièrement dans les

pays à forte proportion rurale engagée dans l'agriculture. De 2010 à 2014, entre 110 000 et 168 000 morts étaient à déplorer chaque année, portant le pourcentage de suicides mondiaux par intoxication aux pesticides, dont les OPP, entre 14% et 20% (Mew et al. 2017). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a quant à elle estimé que le nombre de tentatives de suicide était 20 fois plus important (World Health Organization 2016).

1.3.2. Les agents de guerre

Les premiers OP neurotoxiques (NOP) ont été synthétisés dès les années 1930 par les Nazis mais n'ont pas été utilisés lors de la seconde guerre mondiale. La raison est toujours débattue, mais la plus probable est que les forces allemandes craignaient que les États-Unis et le Royaume-Uni possèdent également des armes chimiques et qu'ils s'en servent à leur tour en riposte. Les premières utilisations confirmées de NOP remonteraient aux années 1980, avec l'utilisation du tabun lors de la guerre Iran-Irak (Delfino et al. 2009).

Malgré les efforts des Nations Unies pour interdire l'utilisation des armes chimiques lors de conflits, concrétisés par une convention sur l'interdiction des armes chimiques (CIAC, ou CWC en anglais), de nombreux incidents impliquant des NOP ont été reportés ces dernières années. Ainsi, le sarin a été utilisé dans une attaque terroriste en 1994 à Matsumoto, au Japon, et quelques mois plus tard dans le métro de Tokyo en 1995, mais également en Syrie en 2013 et en 2017 (Herbert et al. 2019; John et al. 2018). En 2017, Kim Jong-nam, le demi-frère du dirigeant suprême de la Corée du Nord, fut assassiné par intoxication au VX. Plus récemment encore, en 2018, on peut noter l'utilisation des agents Novichok, une série de NOP développée par l'URSS, lors de l'empoisonnement de Sergei Skripal, un ancien agent de renseignement militaire russe puis espion britannique, et en 2020 lors de l'empoisonnement de l'activiste anti-corruption Alexei Navalny (Harding 2020). Tous ces événements prouvent que malgré l'interdiction d'utilisation des armes chimiques, la menace reste bel et bien d'actualité et elle concerne aussi bien les militaires que la population civile.

1.4. Mécanisme d'action

Les OP sont connus pour leurs propriétés neurotoxiques. Ce sont des inhibiteurs des cholinestérases, et en particulier de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme impliquée dans l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh) en acétate et choline.

L'ACh est un neurotransmetteur qui est synthétisé au niveau du cytoplasme des terminaisons axonales. On la retrouve donc au niveau des synapses, mais aussi des jonctions neuromusculaires. Une fois sécrétée par le neurone pré-synaptique, l'ACh se fixe sur des récepteurs cholinergiques qu'on peut diviser en 2 catégories : les récepteurs nicotiniques (nAChR), qu'on retrouve surtout dans le système nerveux parasympathique, et les récepteurs muscariniques (mAChR), surtout localisés au niveau du système nerveux central (SNC) et notamment les jonctions neuromusculaires des muscles lisses (Peters and Dykewicz 2020; Saternos et al. 2017). Une fois que l'ACh a transmis le signal nerveux à la cellule post-synaptique (autre neurone ou cellule musculaire), l'acétylcholinesterase (AChE) vient l'hydrolyser très rapidement afin de mettre fin à la transmission (Purves et al. 2001) (**Figure 3**). C'est d'ailleurs une des enzymes les plus efficaces dans la nature, avec une vitesse de réaction supérieure à 10 000 molécules dégradées par seconde, le taux de diffusion de l'ACh vers le site catalytique étant le facteur limitant de la réaction (Quinn 1987).

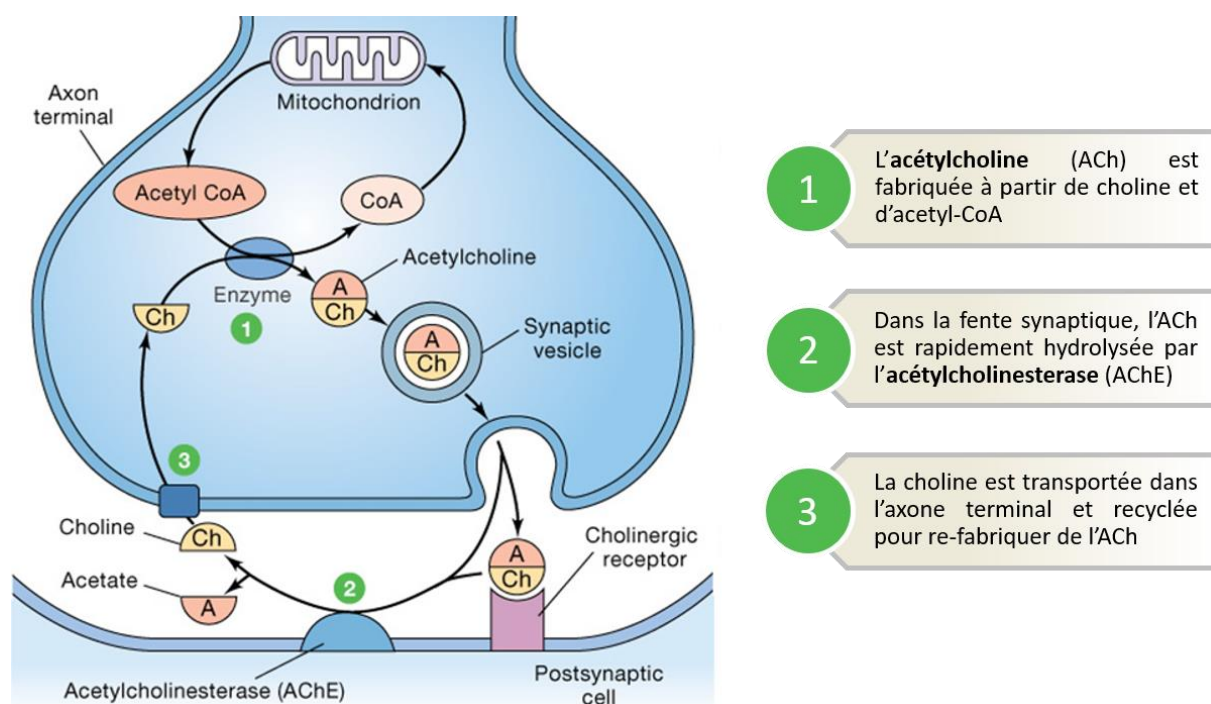


Figure 3 : schéma de transmission du signal nerveux via l'acétylcholine
(Source inconnue)

Le site actif de l'AChE est constitué d'une triade catalytique située à l'intérieur d'une gorge de 2 nm de profondeur et est formée par les acides aminés Glu334, His447 et Ser203 (séquence humaine). On retrouve au fond de cette gorge un site anionique, proche des résidus Trp86 et Trp337, qui permet de stabiliser la charge positive de l'ACh sur le groupe choline, et un site « estérasique », composé des acides aminés Gly121, Gly122 et Ala204, qui permet de

stabiliser le groupe acétyl (Bennion et al. 2015). L'ACh est ensuite hydrolysée par la sérine active (Ser203) (**Figure 4**).

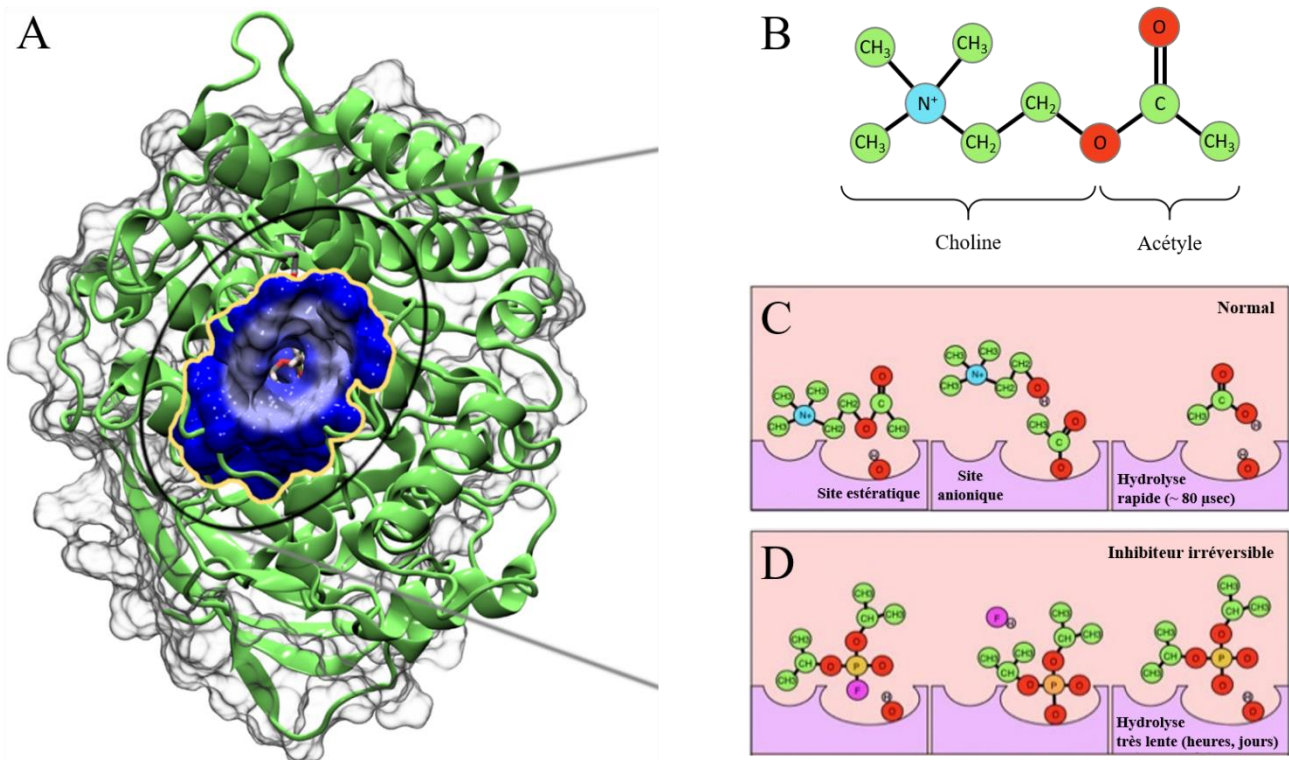


Figure 4 : représentation 3D de l'acétylcholinesterase et schéma de son fonctionnement

(**A**) Représentation 3D de l'acétylcholinesterase (AChE) montrant l'entrée de la gorge enzymatique. Tirée de Bennion et al, 2015. (**B**) Structure de l'acétylcholine (ACh), avec les groupes acétyl et choline représentés. (**C**) Schéma de la réaction enzymatique entre l'AChE et l'ACh et (**D**) entre l'AChE et un inhibiteur irréversible, ici le diisopropylfluorophosphate (DFP).

Les OP inhibent l'AChE en établissant une liaison covalente entre l'atome de phosphore de l'OP et la sérine active de l'AChE, rendant ainsi le site actif de l'enzyme inaccessible au substrat physiologique, l'acétylcholine. L'inhibition de l'AChE, responsable de la toxicité aiguë des OP, entraîne ainsi une accumulation d'acétylcholine au niveau des fentes synaptiques et des jonctions neuromusculaires. Cela a pour conséquences de stimuler excessivement les récepteurs muscariniques et de suractiver puis de désensibiliser les récepteurs nicotiniques. Ces récepteurs étant localisés dans la plupart des organes du corps, leur suractivation ou leur désensibilisation génère un syndrome cholinergique, qui se traduit par une multitude de symptômes périphériques et centraux comme par exemple des nausées, des vomissements, ou encore des hypersécrétions bronchique, salivaire, nasale et lacrymale, mais aussi des convulsions, un coma, une détresse respiratoire et des crises d'épilepsie (Lotti 2010; Saïssy and

Rüttimann 1999). Si l'intoxication aiguë à un OP n'est pas rapidement traitée, il s'ensuit généralement une mort par asphyxie, due notamment à la paralysie des muscles respiratoires. Il apparaît donc primordial que l'intoxication aiguë soit traitée au plus vite, d'autant plus que l'OP, lié de façon covalente à l'AChE, peut subir un processus dit de « vieillissement », rendant l'adduit AChE-OP réfractaire aux traitements actuels de réactivation. Ce vieillissement est en fait une désalkylation, c'est-à-dire la perte d'un second groupe partant (le premier ayant permis la formation de l'adduit AChE-OP), produisant ainsi un oxyanion (molécule anionique où la charge négative est portée par un atome d'oxygène) stabilisé par la charge positive située sur l'histidine catalytique His447 (Zhuang et al. 2016).

Bien que l'AChE soit la cible principale des OP (OP cholinergiques), ces derniers peuvent aussi inhiber la *neuropathy target esterase* (NTE), aussi appelée estérase neurotoxique, auquel cas ils sont qualifiés d'OP neuropathiques. La quantification de l'inhibition de la NTE lymphocytaire permettrait de prédire la survenue d'une neuropathie tardive, encore appelée neuropathie post-intervallaire (Costa 2018; Lotti et al. 1986; Minton and Murray 1988; Thabet et al. 2009). Une autre cible des OP est la butyrylcholinestérase (BChE), aussi appelée pseudocholinestérase. La BChE est une enzyme dont les fonctions physiologiques sont mal connues (Lotti 2010). Le corps humain contient 10 fois plus de BChE que d'AChE (environ 680 nanomoles de BChE contre 62 nanomoles d'AChE) (Manoharan et al. 2007), mais son inhibition ne semble pas avoir de conséquences cliniques (Eddleston et al. 2008). Cette enzyme était donc d'un intérêt moindre, jusqu'à ce que les scientifiques lui suggèrent un intérêt potentiel et que le Département de Défense des États-Unis alloue plusieurs millions de dollars pour la production massive de BChE humaine pure, dans un but de protection contre les agents neurotoxiques (Masson and Lockridge 2010). En effet, des études montrent qu'un pré-traitement à la BChE humaine permet de protéger des cochons d'inde contre 5 fois la LD₅₀ du soman ou du VX (Saxena et al. 2006). L'utilisation de la BChE comme *bioscavenger*, ou bioépurateur, pour retirer les OP de la circulation sanguine est donc une nouvelle possibilité de traitement (Naughton and Terry 2018).

1.5. Traitements actuels

Les traitements actuels contre l'intoxication aux OP n'ont pas ou peu évolué dans les 40 dernières années. Ils sont généralement composés (1) d'atropine pour calmer les symptômes

muscariniques, (2) d'oximes pour réactiver l'AChE et (3) de benzodiazépines comme anti-convulsivants.

1.5.1. L'atropine

L'atropine est un antagoniste compétitif de l'ACh pour les récepteurs muscariniques (mAChRs). Les 2 ligands ont de très grandes affinités pour ces récepteurs, avec des constantes de dissociation (K_D) de 20 nM pour l'ACh et de 1 nM pour l'atropine. Cela signifie que l'atropine est 20 fois affine que l'ACh pour ces récepteurs. L'atropine étant un inhibiteur des mAChRs, elle permet de calmer les symptômes muscariniques induit par l'exposition aux OP et permet ainsi de soulager des symptômes sévères tels que la détresse respiratoire. Les seules limitations de ce traitement sont qu'il ne fonctionne pas sur les récepteurs nicotiniques et qu'il n'est que symptomatique (Uchida et al. 1978; Worek et al. 2020).

1.5.2. Les oximes

Les oximes sont utilisées en tant que réactivateurs de l'AChE. Elles agissent en dé-phosphorylant la sérine active du site catalytique de l'AChE par attaque nucléophile, ce qui a pour effet de défaire la liaison AChE-OP et de restaurer l'activité de l'enzyme. Cependant, le vieillissement de l'adduit AChE-OP rend cette réactivation enzymatique impossible (**Figure 5**). En effet, l'oxyanion résultant du vieillissement de l'adduit AChE-OP est non seulement stabilisé par l'His447, mais sa charge négative provoque également une répulsion électrostatique de l'oxime, empêchant ainsi l'attaque nucléophile (Worek et al. 2020). Le temps nécessaire au vieillissement de l'adduit AChE-OP dépend de la nature de l'OP, il est donc essentiel de pouvoir identifier l'OP responsable de l'intoxication pour la traiter au mieux. Ainsi, pour l'adduit formé avec le soman, le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) est de l'ordre de quelques minutes, tandis que celui du sarin est d'environ 5 h, et celui du tabun et du VX est supérieur à 40 h (Balali-Mood, Balali-Mood, and Balali-Mood 2016). Une possibilité thérapeutique pour remédier à cette résistance aux oximes suite au vieillissement de l'adduit AChE-OP serait de réalkyler l'adduit AChE-OP « vieilli », ce qui permettrait à nouveau d'utiliser une oxime pour la réactivation de l'AChE. Cependant, de tels composés n'ont pas encore été découverts (Zhuang et al. 2016).

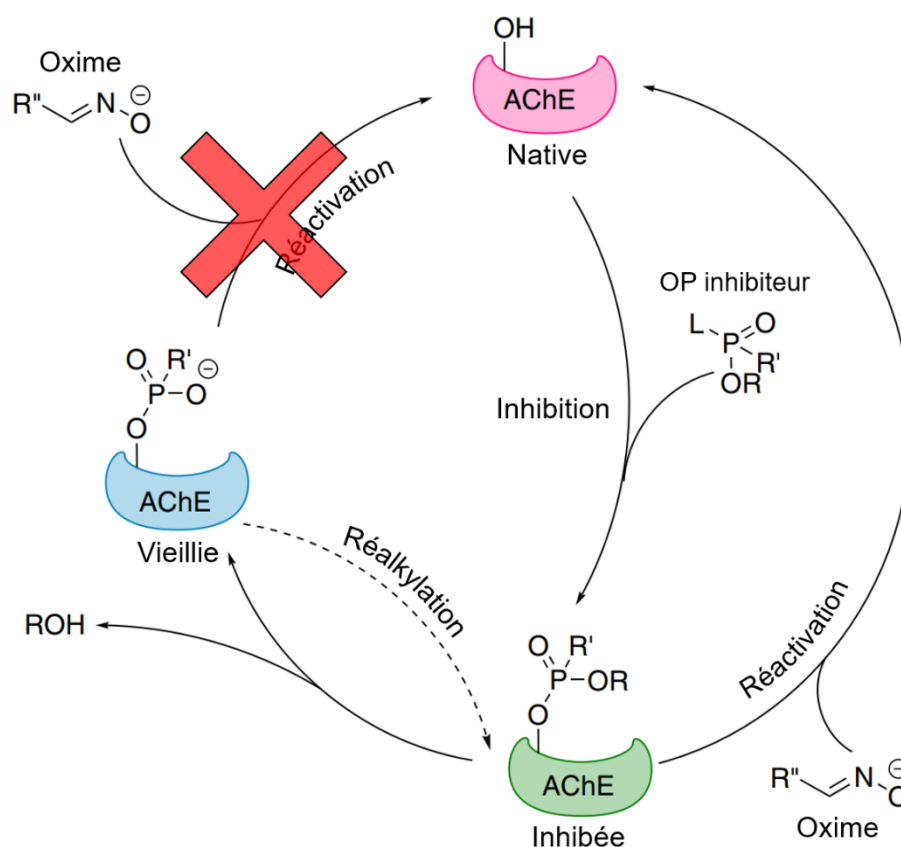


Figure 5 : inhibition, réactivation, réalilylation ou vieillissement de l'AChE après exposition à un OP

Le « L » dans la structure de l'OP inhibiteur représente le groupe partant lors de l'inhibition (« leaving » group). Lorsque l'AChE inhibée par l'OP a « vieilli », la réactivation par l'oxime n'est plus possible. Une stratégie serait de réalilyler l'AChE vieillie pour retourner à une structure réactivable par les oximes. Deux mécanismes sont possibles pour la désalkylation : 1) une hydrolyse, ou 2) une désalkylation spontanée. Traduit et adapté de Zhuang et al. (2016)

Actuellement, les oximes les plus courantes sont des dérivés de pyridinium (mono ou bis) comme la pralidoxime (aussi connu sous le nom de 2-PAM), l'obidoxime, le HI-6, ou encore le HLö-7. L'utilisation d'une oxime plutôt qu'une autre dépend de l'OP responsable de l'intoxication (**Tableau 2**). Leur efficacité de réactivation de l'AChE est déterminée par la force nucléophile du groupe oxime attaché au groupement pyridinium et de son affinité avec l'adduit AChE-OP. Cependant, malgré le grand nombre d'oximes développées, il n'existe pas encore, à ce jour, d'oxime « universelle ». Elles ont toutes un spectre d'efficacité limité : d'une part, les oximes H (Hi-6 et HLö-7) semblent plus efficaces contre les agents NOP, notamment le sarin et le VX ; d'autre part, la pralidoxime et l'obidoxime semblent assez efficaces pour traiter les empoisonnements par OPP (Kassa 2002; Masson and Nachon 2017). On notera cependant que le HLö-7 présente le spectre d'efficacité le plus intéressant (Balali-Mood et al. 2012). Enfin, un

problème majeur des oximes est que ce sont des molécules polaires. En effet, cette polarité se traduit par un caractère hydrophile de ces molécules, ce qui a pour conséquence que leur passage au niveau de la BHE est très limité, voire inexistant (Malfatti et al. 2017), empêchant ainsi la réactivation de l'AChE du SNC (Kalász et al. 2015).

Oximes	Tabun (GA)	Sarin (GB)	Soman (GD)	VX
Pralidoxime	+	+/-	-	+
Obidoxime	+/-	+	+/-	+
HI-6	+	++	+/-	+
HLö-7	++	+	++	+/-

Tableau 2 : efficacité relative des différentes oximes contre le tabun, le sarin, le soman et le VX

- : moins efficace ; +/- : partiellement efficace ; + : modérément efficace ; ++ : plus efficace
Adapté de Balali-Mood and Saber 2012

1.5.3. Les benzodiazépines

Les benzodiazépines sont une classe de composés organiques qui agissent en tant que déprimeurs du SNC. Les plus utilisées sont le diazépam, le lorazépam et le midazolam.

Lors d'une intoxication à un OP, les benzodiazépines sont utilisées pour prévenir ou arrêter les convulsions ou les crises épileptiques. Elles interviennent au niveau des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et plus précisément au niveau des récepteurs ionotropes GABA de type A (GABA_AR), le GABA étant le neurotransmetteur inhibiteur principal du SNC. Les benzodiazépines sont des modulateurs allostériques des récepteurs au GABA : elles se fixent sur un site proche du site de fixation du GABA, ce qui a pour conséquence d'augmenter la fréquence d'ouverture du canal chlorure. Les ions chlorures s'engouffrent alors dans la cellule, ce qui provoque une hyperpolarisation qui rend la cellule moins sensible à la dépolarisation cholinergique. Cela résulte en une neurotransmission inhibitrice plus prononcée, et par conséquent, en une action anti-convulsivante (Bajracharya, Prasad, and Ghimire 2016; Balali-Mood and Saber 2012).

De nombreuses études animales ont montré que les benzodiazépines réduisent la morbidité et la mortalité induite par l'intoxication aux OP (Lotti 2010). Chez l'Homme, on ne retrouve aucune étude clinique puisqu'il serait aujourd'hui jugé non-éthique d'effectuer un

essai randomisé contrôlé. Malgré cela, les benzodiazépines sont considérées comme le traitement standard pour traiter les crises d'épilepsie et les agitations provoquées par les intoxications aux OP. Le diazépam est d'ailleurs recommandé par l'OMS (World Health Organization 2008).

1.6. Le diisopropylfluorophosphate (DFP)

Dans cette étude, nous avons utilisé le diisopropylfluorophosphate (DFP) pour modéliser l'intoxication à un OP. Le DFP est un OP analogue à ceux issus de la série G, notamment le sarin (Li et al. 2017). Pour cette raison, mais aussi parce qu'il est moins toxique et moins volatil que les OP de la série G, et de ce fait, moins dangereux à manipuler, il est largement utilisé pour des études de toxicologie (Brenet et al. 2020; Sogorb et al. 2015). Les premières traces historiques de la synthèse du DFP remontent à 1937, avec un brevet déposé par Gerhard Schrader, mais qui ne sera publié qu'en 1952 (Sogorb et al. 2015).

Dans le domaine de la recherche, le DFP est utilisé pour modéliser l'intoxication aux OP, en particulier pour réaliser des études de cinétique, de toxicologie et de pharmacologie dans le cadre de l'inhibition de l'AChE par les OP, ou encore pour modéliser le syndrome de la guerre du Golfe, un syndrome chronique affectant les vétérans de la guerre du Golfe Persique (1990-1991) (Belgrad et al. 2019; Locker et al. 2017; Ojo et al. 2014). Il est aussi utilisé en tant que marqueur radioactif pour l'étude du renouvellement et de la durée de vie de certaines cellules humaines comme les érythrocytes ou les granulocytes (Raab 1965; Sogorb et al. 2015), et en traitement du glaucome (Raiford 1949; Stamper, Lieberman, and Drake 2009).

Bien que cela n'ait pas été observé lors de nos expériences, il est à noter qu'il a récemment été montré dans des expériences utilisant le DFP dans 0,1% de DMSO, que le DFP pouvait se volatiliser, contaminant ainsi les puits contrôles voisins. Cette contamination s'est traduite par une mort anormale des larves contrôles (exposées à 0,1% de DMSO) (Mundy, Mendieta, and Lein 2021).

II. L'épilepsie et les crises d'épilepsie

L'épilepsie est une affection neurologique chronique. Longtemps considérée comme un trouble neurologique, elle est reconnue depuis 2014 comme une maladie par la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE, pour *International League Against Epilepsy*). Elle

toucherait environ 50 millions de personnes dans le monde d'après l'OMS, ce qui en fait une des maladies neurologiques les plus communes au monde (World Health Organization 2019). C'est aussi une des plus vieilles pathologies de l'Humanité, avec des écrits mentionnant des symptômes très similaires, remontant à 4 000 ans avant J.-C. (World Health Organization 2019). En France, on compte entre 500 000 et 600 000 patients, avec environ 30 000 nouveaux cas par an (Bertran 2018). L'épilepsie peut toucher n'importe quelle population, à n'importe quel âge, mais son incidence possède une distribution bimodale, avec un risque beaucoup plus important pour les nourrissons (moins d'un an) et les personnes au-delà de 50-60 ans (Thijs et al. 2019).

2.1. Définitions

L'épilepsie se caractérise par la répétition spontanée et une prédisposition durable à générer des phénomènes cliniques transitoires appelés « crises d'épilepsie ». Selon le rapport officiel de 2014 de l'ILAE, un patient est atteint d'épilepsie s'il remplit l'une des 3 conditions suivantes : (1) le patient a subi au moins 2 crises d'épilepsie spontanées sur une période de temps supérieure à 24h ; (2) le patient a subi une crise spontanée et le risque de récurrence est élevé (> 60% sur une durée de 10 ans, équivalent au risque de récurrence après avoir subi 2 crises spontanées) ; ou (3) le patient a été diagnostiqué d'un syndrome d'épilepsie (Fisher et al. 2014). Le terme « spontanée » implique qu'il n'existe pas de facteur temporaire ou réversible qui abaisserait le seuil de sensibilité et produirait une crise d'épilepsie à un moment donné. Ce terme est cependant relativement imprécis étant donné qu'on ne peut jamais exclure complètement l'existence d'un tel facteur.

Ainsi, la définition de l'épilepsie implique qu'il y ait eu au moins une crise spontanée. Cependant, la survenue d'une crise spontanée ne signifie pas que le patient est atteint d'épilepsie. Il convient donc de faire attention à bien distinguer crises d'épilepsie et épilepsie, et de la même façon, il faut différencier l'ictogénèse (génération d'une crise) de l'épileptogénèse (développement d'une épilepsie).

2.2. Les crises d'épilepsie

Les crises d'épilepsie sont dues à une activité neuronale excessive et synchronisée dans le cerveau qui se traduit par des décharges électriques d'un groupe de neurones, pouvant se propager à d'autres réseaux neuronaux. Elles peuvent être le résultat d'un déséquilibre de la

balance entre les neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) et les neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA) (Thijs et al. 2019). Les décharges résultant de ce déséquilibre en faveur des neurotransmetteurs excitateurs sont non seulement variables en intensité et en fréquence, mais elles peuvent aussi affecter différentes parties du cerveau. Ainsi, lorsqu'elles sont limitées à un seul hémisphère du cerveau, elles sont dites « focales », en opposition aux crises généralisées, qui elles affectent les deux hémisphères et sont généralement d'origine génétique (Thijs et al. 2019). En 2017, l'ILAE publie une révision de la classification des types de crises d'épilepsie (**Figure 6**) (Fisher et al. 2017). Cette classification tient donc compte de l'origine de la crise (focale, généralisée, d'origine inconnue), mais également de l'état de conscience du patient pendant la crise, notamment lors des crises focales, les crises généralisées entraînant systématiquement une perte de conscience. Enfin, elle distingue les crises accompagnées de symptômes moteurs des crises accompagnées de symptômes non-moteurs. Par exemple, la crise généralisée la plus emblématique est la crise dite « tonico-clonique » (aussi dite « crise convulsive »), qui se manifeste par une perte de conscience, des raidissements et des contractions musculaires (Bertran 2018). Une crise généralisée peut également être atonique (relâchement musculaire), myoclonique (secousses musculaires), ou encor typique ou atypique (absences). Les crises focales, elles, ont des symptômes très variables selon la localisation du foyer épileptique et le degré de propagation de la décharge (Bertran 2018; Fisher et al. 2017).

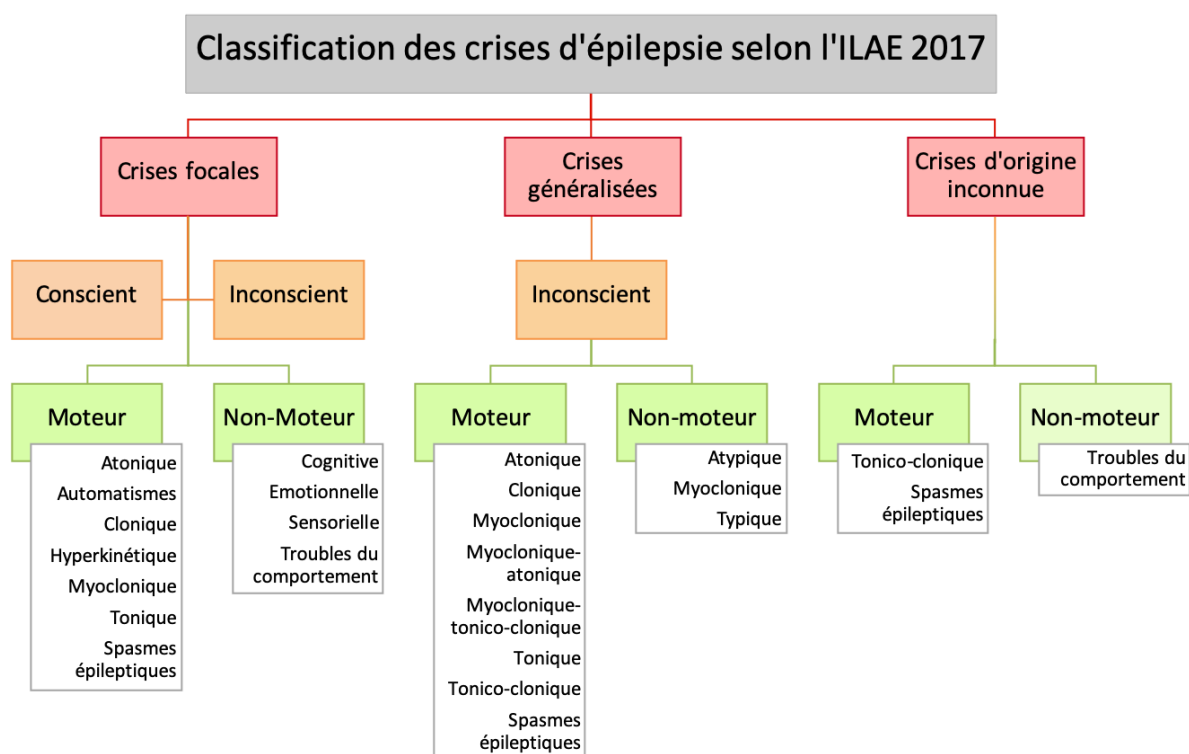


Figure 6 : classification des crises d'épilepsie selon l'ILAE en 2017

La classification de l'ILAE tient compte (1) du foyer de la crise dans le cerveau, (2) de l'état de conscience du patient durant la crise, et (3) des symptômes cliniques. Figure adaptée par Alexandre Brenet, de Fisher et al. 2017.

2.3. Facteurs de risque

La physiopathologie de l'épilepsie est encore mal connue, d'autant plus qu'il s'agit très vraisemblablement d'une maladie multifactorielle. En effet, l'épileptogenèse peut être due à une large diversité de facteurs, incluant des prédispositions génétiques, mais aussi des troubles développementaux, ou encore des agressions neurologiques. Des éléments de réponse existent mais il manque encore beaucoup de pièces pour compléter ce puzzle d'une grande complexité. De plus, la présence de comorbidités n'est pas rare puisque plus de 50% des personnes atteintes d'épilepsie souffrent d'un ou plusieurs autres problèmes médicaux, aussi bien psychiatriques (dépression, anxiété, trouble du spectre autistique, etc.) que somatiques (diabète de type I, ulcères gastriques, etc.) (Thijs et al. 2019).

2.3.1. Prédispositions génétiques

Les formes génétiques d'épilepsie peuvent être divisées en 2 catégories : les épilepsies monogéniques, pour lesquelles une mutation dans un seul gène est responsable du phénotype épileptique (5-10% des cas d'épilepsie), et les épilepsies génétiques complexes, pour lesquelles la combinaison des effets de plusieurs mutations semble être à l'origine de la maladie. Les premières mutations découvertes étaient principalement dans des gènes codant des canaux ioniques. Ces derniers peuvent être voltage-dépendants comme *SCN1A*, qui a été impliqué pour la première fois dans l'épilepsie en 2000 (Claes et al. 2001; Scheffer and Nabbout 2019), ou ligand-dépendants comme *GABRG2* (Baulac et al. 2001), impliqué pour la première fois dans l'épilepsie en 2001. Cependant, d'autres mutations ont été trouvées dans des récepteurs neuronaux, des facteurs de transcription, ou encore des enzymes. En 2016, près de 1 000 gènes étaient décrits comme étant associés à de l'épilepsie, dont 84 qui sont considérés comme des gènes épileptiques, c'est-à-dire des gènes qui causent des épilepsies ou des syndromes épileptiques comme symptôme majeur (Wang et al. 2017). Chez le poisson zèbre, une dizaine de modèles d'épilepsie génétiques existent (Gawel et al. 2020).

2.3.2. Équilibres ioniques et balance synaptique excitation/inhibition

Dans des circonstances physiologiques, les crises d'épilepsie n'apparaissent pas de façon spontanée car la physiologie neuronale maintient la stabilité des membranes plasmiques, empêchant ainsi la propagation de décharges synchronisées, responsable de l'initiation d'une crise. C'est la rupture de cette stabilité qui peut provoquer une crise. Par exemple, il a été montré que la dynamique des échanges ioniques, qui est à la base de l'activité neuronale, était perturbée dans un contexte ictogène. Ainsi, l'hyponatrémie, un trouble défini par une concentration sodique trop faible dans le plasma sanguin, est connue pour causer fréquemment des crises épileptiques (Nardone, Brigo, and Trinka 2016; Raimondo et al. 2015). Un autre déséquilibre rompant la stabilité de la physiologie neuronale est le déséquilibre entre les conductances synaptiques excitatrices (E) et inhibitrices (I). En effet, des études pharmacologiques ont montré que des antagonistes des récepteurs au GABA (neurotransmetteur inhibiteur principal du SNC) et des agonistes des récepteurs au glutamate (neurotransmetteur excitateur principal du SNC) pouvaient provoquer des crises d'épilepsie dans des animaux sains (Flynn and Babi 2016). Ainsi, ce déséquilibre de la balance synaptique E/I a été validé comme étant un mécanisme générant des crises (ictogène). Quant à l'épilepsie, sa physiopathologie est encore mal comprise et la majorité des mutations identifiées dans l'épilepsie impliquent la perte de fonction de gènes qui ne sont pas directement impliqués dans cette balance (Staley 2015; Yuen, Keezer, and Sander 2018). Il est donc difficile d'extrapoler ce mécanisme à l'épileptogenèse, c'est-à-dire comme étant un mécanisme qui rend le cerveau sensible à des crises répétées et durables.

2.3.3. Antécédents d'atteintes cérébrales

L'épilepsie est souvent associée à un antécédent d'atteinte du système nerveux tel que l'hypoxie ou un traumatisme crânien. Ces agressions neurologiques sont elles-mêmes associées à de la mort neuronale, à des modifications synaptiques dysfonctionnelles et à la génération d'un réseau hyperexcitable. Les infections, les accidents vasculaires cérébraux, ou les tumeurs cérébrales sont d'autres exemples d'événements pouvant induire des crises et de l'épilepsie. Ces lésions peuvent par ailleurs induire une sclérose temporale méssiale, aussi appelée sclérose de l'hippocampe, qui est très souvent associée à une épilepsie du lobe temporal (Rana and Musto 2018). Les raisons pour lesquelles ces agressions rendent le cerveau d'un patient plus susceptible à faire des crises d'épilepsie ne sont pas complètement connues, mais une hypothèse de plus en plus étudiée et soutenue est qu'elles induisent une neuroinflammation, et que cet état

inflammatoire jouerait un rôle dans l'épileptogenèse (Riazi, Galic, and Pittman 2010; Webster et al. 2017).

2.3.4. L'inflammation

La plupart des facteurs de risque communs aux crises d'épilepsie cités précédemment sont accompagnés de différents niveaux d'inflammation du SNC qui, par la suite, ont été associés à la survenue de crises d'épilepsie. Les crises induisent à leur tour une réponse inflammatoire du cerveau via l'activation des astrocytes et des cellules immunitaires résidentes, les cellules microgliales, et la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines.

La relation entre les médiateurs pro-inflammatoires et les crises d'épilepsie a reçu une attention grandissante ces dernières années. De nombreux résultats cliniques et expérimentaux suggèrent en effet que les infections ou l'inflammation peuvent contribuer à la prédisposition aux crises épileptiques. Cette hypothèse est soutenue par 2 observations : (1) la surexpression de signaux pro-inflammatoires dans le foyer épileptique durant l'épileptogenèse et (2) le fait que le ciblage pharmacologique de voies pro-inflammatoires particulières montre des effets anti-épileptiques (Ravizza, Balosso, and Vezzani 2011). Il a ainsi été montré que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-2 ou encore l'IL-6, qui sont normalement en faibles concentrations dans le cerveau, étaient en quantités plus importantes après une crise d'épilepsie. De la même façon, les ARN messagers (ARNm) de ces cytokines ainsi que les ARNm du TNF- α et du facteur de croissance transformant (TGF, pour *Transforming Growth Factor*) β 1 sont surexprimés suite à une crise (Scorza et al. 2018).

Il a été suggéré que l'IL-1 β induit des crises en activant les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans les cellules post-synaptiques via l'activation de leur sous-unité GluN2B, aussi appelée NR2B (Viviani et al. 2003). Par ailleurs, une autre étude a montré que la production d'ARNm de GluN2B augmente 24 heures après une crise et que ces changements dans la composition des sous-unités pouvaient aboutir à une altération de la plasticité synaptique (Postnikova et al. 2017).

La relation entre l'inflammation et la balance synaptique E/I implique d'autres cellules non neuronales, dont la microglie (discuté dans la section "3.6. La microglie dans l'épilepsie") et les astrocytes. En effet, il a été observé dans des cultures de cellules humaines et de rats que la réadmission du glutamate dans les astrocytes était inhibée. Les astrocytes sont des cellules

gliales du SNC dont les rôles dans l'homéostasie du cerveau, en termes d'équilibres ioniques et de régulation synaptique par exemple, sont très importants. Ce sont des cellules cruciales pour la survie et le bon fonctionnement des neurones, et en particulier lors d'une activité synaptique intense. En effet, ils permettent d'éviter que les neurotransmetteurs comme le glutamate ne se répandent en dehors de la fente synaptique, régulant ainsi les « cross-talk » avec les synapses voisines et l'activation de récepteurs glutamatergiques péri- ou extra-synaptiques. Dans un contexte d'inflammation, les astrocytes sont impactés par les cytokines, qui inhibent la recapture du glutamate par les astrocytes, ce qui a pour conséquence d'augmenter la concentration du glutamate dans l'espace synaptique, condition associée au stade pré-ictal (Riazi et al. 2010; Webster et al. 2017) (Figure 7).

Par ailleurs, on notera également que l'inflammation contribue à la dégradation de la BHE, ce qui permet à d'autres cellules ou médiateurs inflammatoires de pénétrer plus facilement dans le cerveau et d'y causer davantage de dommages (Rana and Musto 2018), entretenant ainsi un cercle vicieux entre la neuroinflammation et l'excitation neuronale (Figure 7).

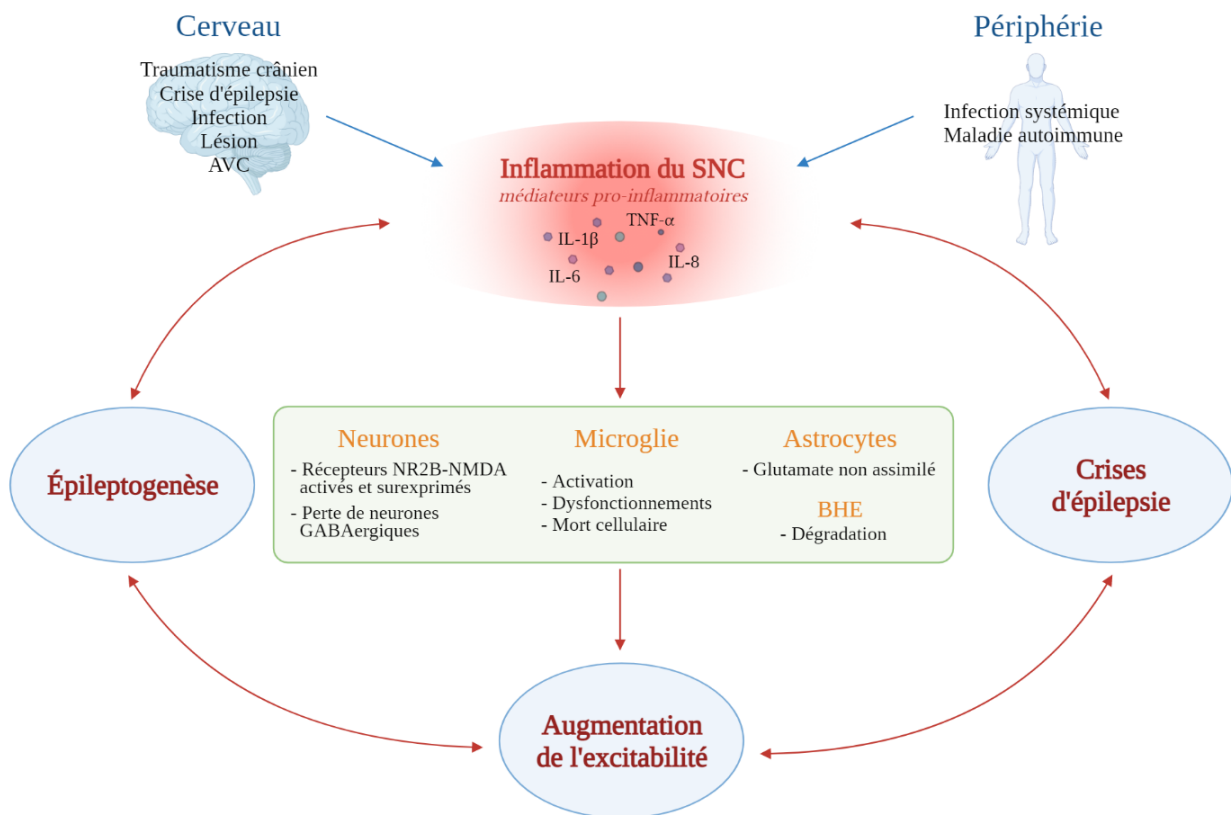


Figure 7 : cycle auto-entretenu de l'inflammation et de l'épilepsie

Créé avec BioRender.com

III. La microglie

Il apparaît clairement que l'inflammation joue un rôle très important dans l'épilepsie et les crises d'épilepsie. L'inflammation se fait par la production de cytokines, de chémokines (aussi appelées chimiokines), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou encore de messagers secondaires. Dans le cas de la neuroinflammation, ces molécules sont produites en grande majorité par les astrocytes et la microglie.

3.1. Historique

La microglie a été découverte vers la fin du XIX^{ème} siècle, avec les premières descriptions histologiques réalisées par Franz Nissl grâce à une technique de coloration mise au point par lui-même, la coloration de Nissl, et qui les décrit comme des « cellules bâtons ». Plus tard, une nouvelle technique de coloration à l'argent, mise au point par Camillo Golgi et optimisée par Santiago Ramón y Cajal, la coloration de Golgi, a permis une meilleure observation de ces nouvelles cellules. Ainsi, Pío del Río Hortega, un des disciples de Ramón y Cajal, observe en 1919 les nombreuses ramifications des cellules microgliales, semblables aux branches d'un arbre, et leur prédit une fonction phagocytaire (**Figure 8**). Il est le premier à les nommer « microglie » et est considéré comme le « père de la microglie » (Nayak, Roth, and McGavern 2014).

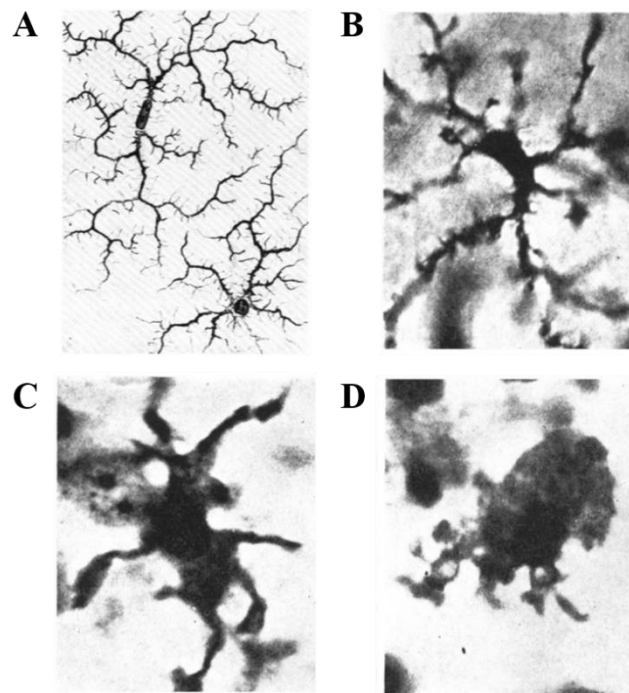


Figure 8 : observations de la microglie par del Río Hortega à l'aide de la coloration de Golgi

(A) Cellules microgliales ramifiées dessinées par del Río Hortega et photos de l'évolution d'une cellule microgliale pendant son activité phagocytaire. (B) la microglie possède des prolongements épais et ramifiés. (C) Microglie avec des prolongements plus courts et un corps cellulaire plus gros. (D) Microglie amiboïde. Tiré de Kettenmann et al., 2011

Par la suite, il faut attendre les années 1990 pour voir l'intérêt pour la microglie réellement émerger et croître de façon exponentielle (**Figure 9**).

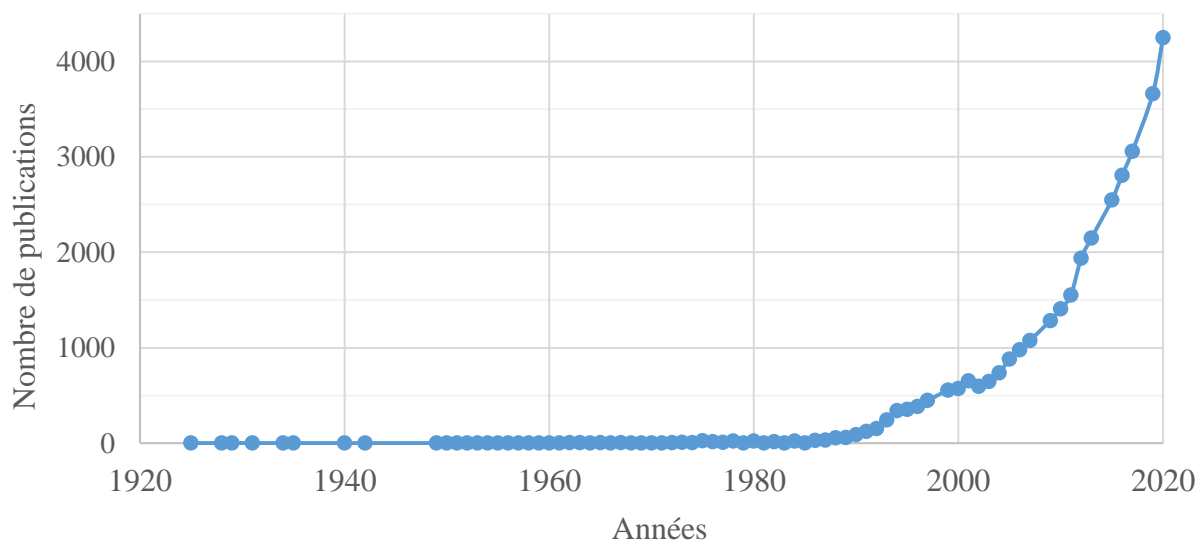


Figure 9 : évolution du nombre d'articles traitant de la microglie au cours des années

Nombre d'articles publiés traitant de la microglie annuellement d'après la base de données PubMed Central (www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov), entre 1925 et 2020. Les données obtenues sont les quantités d'articles publiés répondant au mot clé « microglia ». Entre 1925 et 1985, 5 articles par an étaient publiés en moyenne. Puis, on observe une croissance exponentielle.

3.2. Description

En plus des neurones, le cerveau possède des cellules gliales qui représentent environ 50% de la population cellulaire cérébrale (von Bartheld, Bahney, and Herculano-Houzel 2016). Ces cellules constituent l'environnement des neurones et assurent un bon nombre de fonctions comme le maintien de l'homéostasie du cerveau et l'élimination de cellules mortes par exemple. La glie est composée de 3 types cellulaires principaux : les oligodendrocytes, les astrocytes, et la microglie.

La microglie est le premier type cellulaire glial à entrer dans le cerveau chez la souris (Reemst et al. 2016), le colonisant vers le jour embryonnaire E8,5. Chez l'Homme, des cellules

ressemblant à la microglie et des cellules microgliales ramifiées ont pu être détectées à 13 et 21 semaines de gestation respectivement (Wolf, Boddeke, and Kettenmann 2017). La microglie représente entre 10% et 15% de la population cellulaire du SNC (Nayak et al. 2014). Les nombreuses années de recherche autour de ce type cellulaire ont abouti à l'idée que la microglie est une population de cellules du système immunitaire inné du SNC. Ce sont des cellules du SNC avec des fonctions de mémoire qui ressemblent aux macrophages. Elles sont d'ailleurs considérées comme faisant partie du système phagocytaire mononucléé. Ce qui les différencie des macrophages, cependant, c'est qu'elles ont la capacité de communiquer avec les cellules de leur environnement, i.e. les autres cellules gliales et les neurones, mais également avec les vaisseaux sanguins (Var and Byrd-Jacobs 2020). De plus, comme l'avait décrit del Río Hortega, les cellules microgliales sont des cellules ayant un petit corps cellulaire et de nombreux prolongements très ramifiés à l'état de « repos » (en réalité, il s'agit plutôt d'un état de « surveillance »), une morphologie qui les distingue des macrophages. Par ailleurs, ce sont des cellules très plastiques, ayant la capacité de se transformer rapidement d'une cellule sensorielle à l'état de « repos »/surveillance, à une cellule phagocytaire à l'état activé (Var and Byrd-Jacobs 2020).

3.3. Quelques facteurs impliqués dans le développement de la microglie

Durant le développement, des cellules myéloïdes progénitrices vont se différencier en microglie. Ce programme développemental est contrôlé par diverses molécules comme, entre autres, des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, ou encore des chémokines. Les éléments ci-dessous en font partie.

3.3.1. CX3CL1 ou fractalkine

La fractalkine est une chémokine produite par les neurones qui peut être sous forme libre (soluble) ou membranaire, et qui est soupçonnée d'avoir un rôle important pour promouvoir le rôle de la microglie durant le développement. La microglie est d'ailleurs le seul type cellulaire dans le cerveau à exprimer son récepteur, CX3CR1 (Wolf et al. 2017). Cette voie de signalisation fractalkine-CX3CR1 est essentielle dans la régulation des interactions entre la microglie et les neurones (Araki, Ikegaya, and Koyama 2020; Kierdorf and Prinz 2013), et semble aussi impliquée dans la modulation de la neurogenèse adulte (Bachstetter et al. 2011).

De plus, elle permet à la microglie de sécréter des facteurs de croissance, tels que des facteurs neurotrophiques et des cytokines, qui permettent de favoriser le développement des neurones chez l'adulte (Araki et al. 2020). Par ailleurs, l'élagage synaptique serait en partie dû à cette voie de signalisation, comme le suggère une étude dans laquelle des souris CX3CR1-déficientes avaient des densités dendritiques significativement plus importantes que les contrôles, ainsi qu'une quantité moindre de synapses matures 2 à 3 semaines après leur naissance (Paolicelli et al. 2011). Enfin, des recherches suggèrent que l'interaction fractalkine-CX3CR1 aide également à maintenir la microglie à l'état de surveillance (Hirbec, Rassendren, and Audinat 2019; Nayak et al. 2014).

3.3.2. Runx1

Runx1 est un facteur de transcription à domaine Runt. La protéine est connue comme ayant une fonction cruciale lors de l'hématopoïèse. En effet, une déficience en Runx1 engendre une absence de différenciation des cellules souches embryonnaires d'origine hématopoïétique en progéniteurs érythro-myéloïdes. De plus, la protéine se fixe sur l'élément amplificateur (séquence régulatrice, *enhancer*) de plusieurs gènes associés au développement hématopoïétique pour les moduler. Par exemple, Runx1 se lie à l'élément amplificateur de PU.1 (un facteur de transcription essentiel pour la différenciation des cellules microgliales) et module son expression durant l'hématopoïèse embryonnaire et adulte (Huang et al. 2008). Pour certains gènes qui participent au développement spécifique de progéniteurs multipotents, l'interaction entre Runx1 et l'élément régulateur est même essentielle pour leur expression. Par exemple, l'expression du gène codant le CSF1R (« *colony-stimulating factor receptor* »), dont la fonction est nécessaire pour le développement des cellules myéloïdes, dépend de l'interaction physique entre Runx1 et son amplificateur (Zhang et al. 1996).

Runx1 est exprimé par des précurseurs provenant du sac vitellin qui vont ensuite coloniser le cerveau et se différencier en microglie lors du développement (Ginhoux et al. 2010). À ce stade, la microglie possède une morphologie amiboïde. La diminution progressive de l'expression de Runx1 coïncide avec la transformation morphologique de la microglie qui prend la forme ramifiée caractéristique de l'état de repos/surveillance. Dans un cerveau adulte, Runx1 est de nouveau davantage exprimé à la suite d'un traumatisme du cerveau, suggérant ainsi un rôle additionnel dans la régulation de l'activation microgliale (Zusso et al. 2012).

3.3.3. PU.1

PU.1 fait partie de la famille des facteurs de transcription ETS (*E-twenty six*). Cette famille est exprimée dans divers types cellulaires comme les neutrophiles, les mastocytes, les macrophages et la microglie. Dans des cultures de cellules microgliales murines, PU.1 a été détecté en grande quantité que ce soit à l'état de surveillance ou à l'état activé (Walton et al. 2000). Chez l'humain, l'isolement des cellules microgliales provenant d'autopsies ou de biopsies a permis de montrer que PU.1 était également exprimé, et qu'une perte de fonction par siRNA entraîne une diminution de la viabilité des cellules microgliales humaines et une réduction de leur capacité à phagocyter le peptide bêta-amyloïde₁₋₄₂, dont l'accumulation peut provoquer des maladies comme la maladie d'Alzheimer (Smith et al. 2013). L'importance de PU.1 a été soulignée par une étude montrant les conséquences de son absence dans des souris knock-out (KO). Les souris KO PU.1 étaient sévèrement immuno-déprimées, avec l'absence de macrophages, de neutrophiles, et de lymphocytes B et T matures. En effet, l'absence de PU.1 empêche la maturation des progéniteurs myéloïdes en macrophages, ce qui est mis en évidence par l'absence de marqueurs de différenciation terminale tels que le CSF1R, le CD11b ou le CD64 (Olson et al. 1995). Sauf sauvetage avec de la moelle osseuse sauvage, les souriceaux KO PU.1 meurent dans les 48 heures suivant leur naissance (McKercher et al. 1996).

3.3.4. CSF1R

CSF1R (aussi appelé M-CSFR ou CD115) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. C'est un régulateur essentiel pour la survie, la différenciation, le développement et la chimiotaxie des cellules phagocytaires mononucléées, ce qui inclut les cellules microgliales (Hagan et al. 2020). En effet, les souris mutantes CSF1R^{-/-} sont complètement dépourvues de microglie (Dai et al. 2002). Par ailleurs, une mutation dans le cadre de lecture du gène codant le CSF1, le ligand principal de ce récepteur, a montré une réduction du nombre de macrophages dans les tissus, mais un nombre relativement normal de cellules microgliales (Felix et al. 1990). La mise en relation de ces deux observations suggère donc un autre ligand pour le récepteur. C'est ainsi que l'IL-34 a été découvert comme étant aussi un ligand du CSF1R. Il a ensuite été montré qu'un déficit de l'IL-34 entraînait une diminution d'environ 20% dans la population microgliale (Wang et al. 2012).

3.4. La microglie pendant le développement et en conditions physiologiques

Dans les années qui suivent leur découverte, il a longtemps été pensé que les cellules microgliales n'avaient qu'un rôle de phagocytes. En fait, on pense maintenant qu'elles assurent une connexion importante entre les activités neurologique et immunitaire du SNC (Nayak et al. 2014). En effet, la microglie possède de nombreuses fonctions (**Figure 10**). Parmi ces fonctions, on peut citer sa participation à la détermination du devenir de cellules progénitrices (les progéniteurs des cellules neurales (NPC) et des oligodendrocytes (OPC) par exemple), à la régulation des fonctions neuronales, ou encore à la survie neuronale (Wright-Jin and Gutmann 2019). En effet, pendant le développement, la microglie sécrète des facteurs trophiques qui contribuent à la formation et à la survie des circuits neuronaux. On sait également que durant cette période, près de la moitié des neurones immatures meurent, principalement par apoptose. Ces cellules apoptotiques sont phagocytées par la microglie, qui ne se contente pas seulement de phagocyter ces débris : elle a aussi un rôle actif dans la mort neuronale (Nayak et al. 2014). En effet, il a été observé dans plusieurs cas que la microglie peut sécréter des facteurs de croissance et des ROS qui entraînent une mort cellulaire programmée (Frade and Barde 1998; Wakselman et al. 2008). La microglie peut ensuite procéder à la phagocytose, et ce, sans déclencher de réponse inflammatoire. Cette activité phagocytaire a également lieu dans le SNC adulte, auquel cas elle est initiée par des facteurs sécrétés par les neurones apoptotiques qui permettent de recruter la microglie, garantissant ainsi le bon fonctionnement des réseaux neuronaux adultes (Noda et al. 2011). De plus, la microglie est impliquée dans la formation et l'élagage synaptique lors du développement, dans la formation des neurites (axones ou dendrites), et dans le guidage axonal (Allen and Lyons 2018). Elle facilite également la myélinisation/re-myélinisation, effectuée par les oligodendrocytes, ce qui contribue à leur survie, à leur différenciation et à leur maturation (Traiffort et al. 2020).

En condition physiologique, en plus d'assurer certaines fonctions déjà évoquées, leur rôle principal est de participer à l'homéostasie du cerveau. Pour cela, la microglie possède de nombreux prolongements qui s'allongent et se rétractent en continu, ce qui lui permet de surveiller son environnement. Dans ce cas-là, la microglie est dite « ramifiée » : son corps cellulaire est relativement petit et immobile, et elle possède de nombreux prolongements très ramifiés qui permettent de couvrir une surface importante autour d'elle, qu'elle pourra scanner (Garaschuk and Verkhratsky 2019). On peut distinguer deux morphologies de terminaison pour ces prolongements : fine ou « pointue », pour une activité de surveillance, et « bulbeuse » pour

une activité phagocytaire (Nimmerjahn, Kirchhoff, and Helmchen 2005). Cet état de mouvement perpétuel lui permet de réagir rapidement en cas d'anomalie (Nayak et al. 2014; Sierra, Paolicelli, and Kettenmann 2019).

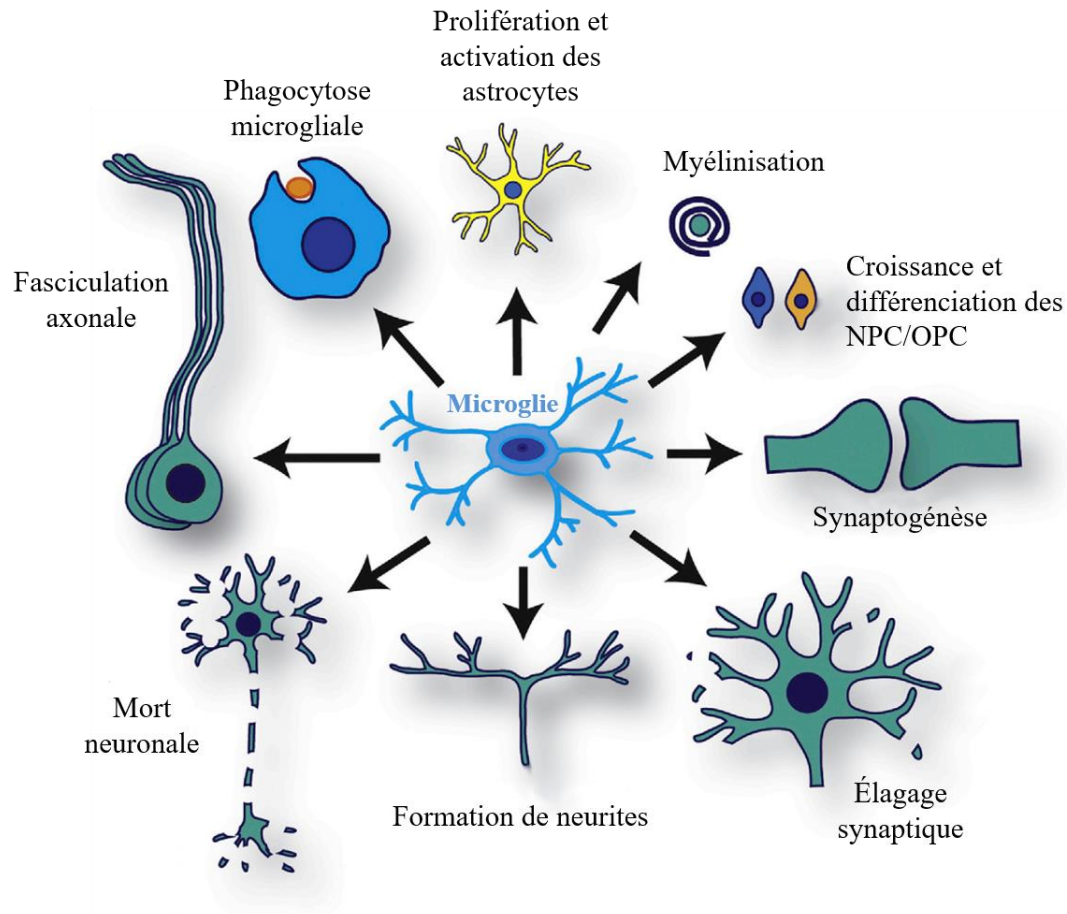


Figure 10 : les nombreuses fonctions de la microglie dans le cerveau

La microglie (au centre) est très importante pour le fonctionnement du cerveau. Ses fonctions incluent la communication avec les astrocytes et les progéniteurs de cellules neurales (NPC) et d'oligodendrocytes (OPC), participant ainsi respectivement à leur prolifération et activation, et à leur croissance et différenciation. Elle participe également à la synaptogénèse, la myélinisation, l'élagage synaptique, la formation de neurites, la mort neuronale, la phagocytose et la fasciculation axonale (processus d'adhérence d'un axone en croissance à un autre). Traduit et adapté de Wright-Jin and Gutmann (2019)

Le comportement dynamique des prolongements de la microglie dépend d'une signalisation purinergique. En effet, la microglie exprime de nombreux récepteurs purinergiques, qu'ils soient ionotropiques (appelés P2X) ou métabotropiques (appelés P2Y). Parmi ces récepteurs, il a été montré que l'activation par l'ATP ou l'ADP de P2Y₁₂, exprimé spécifiquement par la microglie (Sasaki et al. 2003), était nécessaire pour la motilité

microgliale, l'extension des prolongements microgliaux dans des souris $P2rY_{12}^{-/-}$ étant fortement réduite (Haynes et al. 2006). Par ailleurs, CX3CR1 est également impliqué dans cette dynamique. En particulier, il semble que la signalisation CX3CR1 ne soit pas absolument requise pour la mobilité (mouvements cellulaires) et la motilité (mouvements de prolongements) des cellules microgliales, mais qu'elle joue un rôle régulateur de cette dynamique. En effet, l'imagerie d'explants de la rétine de souris $CX3CR1^{-/-}$ montre des prolongements microgliaux toujours motiles, mais à des vitesses significativement moindres. De même, la migration microgliale vers un site de lésion réalisé par un faisceau laser se faisait également, mais beaucoup plus lentement (Liang et al. 2009). De plus, l'étude de tranches de cerveau de souris KO $P2rY_{13}$ a permis de montrer que le récepteur $P2Y_{13}$ a un rôle similaire à celui de CX3CR1 (Kyrargyri et al. 2020).

En dehors de leur fonction de surveillance, les cellules microgliales sont aussi fondamentales pour la régulation du comportement social, l'apprentissage et la mémoire. En effet, ces fonctions se sont retrouvées amoindries chez des souris dont la microglie a été éliminée, mais ont été restaurées après repopulation par ces cellules (Torres et al. 2016).

Dans des conditions homéostatiques, la microglie est une population de cellules ayant une durée de vie assez longue. En effet, chez l'Homme, l'âge des cellules microgliales a pu être calculé en se basant sur le taux de carbone 14 dans l'ADN des cellules. Ainsi, dans un groupe de 12 sujets âgés entre 22 et 69 ans et dont les échantillons ont été prélevés post-mortem, les cellules microgliales étaient en moyenne âgées de 4,2 ans, avec certaines cellules pouvant atteindre plus de 20 ans (Réu et al. 2017). De plus, elles ont un potentiel d'auto-renouvellement remarquable. En effet, la population microgliale reste stable grâce à une balance entre apoptose et prolifération (Var and Byrd-Jacobs 2020). Des études ont ainsi quantifié le taux de renouvellement de la microglie chez la souris, qui serait d'environ 1% par jour (Askew et al. 2017), et chez l'Homme, qui serait d'environ 28% par an soit 0,08% par jour (Réu et al. 2017).

3.5. La microglie en conditions pathologiques

L'activation de la microglie en réponse à des perturbations dans le SNC repose sur 2 systèmes de signalisation : (1) les signaux « On », avec l'apparition de facteurs qui sont normalement absents, en faible concentration, ou dans une configuration différente de celle des conditions physiologiques, e.g. des cytokines, des composés intracellulaires relâchés par des

cellules endommagées, des agrégats de protéines, ... ; (2) les signaux « Off », avec la disparition de signaux qui sont normalement présents en conditions physiologiques et qui contribuent à maintenir la microglie dans son état de surveillance, e.g. la fractalkine, et les glycoprotéines CD200 (Hirbec et al. 2019).

Les cellules microgliales ont également une multitude de molécules de surface sur leur membrane, ce qui leur permet de communiquer avec les cellules environnantes. C'est généralement par leur intermédiaire que la microglie s'active. En effet, la plupart de ces molécules font partie de la famille des récepteurs, comme par exemple les récepteurs aux cytokines, les récepteurs éboueurs (« *scavenger* »), ou encore les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, pour *pattern recognition receptor*) (Kierdorf and Prinz 2013), qui sont très conservés chez les mammifères (Var and Byrd-Jacobs 2020). Ces derniers sont capables de reconnaître 2 grands types de ligands :

- Les DAMPs, motifs moléculaires associés aux dégâts : ce sont des molécules endogènes qui sont sécrétées par les cellules endommagées à la suite d'une blessure ou d'une infection par exemple, et qui promeuvent l'inflammation.
- Les PAMPs, motifs moléculaires associés aux pathogènes : ce sont des molécules exogènes caractéristiques des pathogènes, typiquement les lipopolysaccharides (LPS) bactériens, les endotoxines, ou encore les ARN viraux.

L'activation de certains de ces récepteurs par des molécules inflammatoires ou des pathogènes entraîne la différenciation rapide de la microglie « surveillante » en une cellule effectrice très mobile qui contribue à l'inflammation. Cette transformation microgliale inclut des changements tels que l'expression de gènes, la morphologie de la microglie, sa migration, son métabolisme ou encore sa prolifération et sa mort (Var and Byrd-Jacobs 2020). Suivant les conditions d'activation, la microglie se polarise selon différents types, similaires à la polarisation des macrophages et des monocytes, dont (**Figure 11**) :

- Le type pro-inflammatoire : ce type de réponse implique la surexpression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8 ou le TNF- α , ainsi que la production d'oxyde nitrique (NO) via l'activité de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Ce type d'activation de la microglie, souvent qualifié d'activation « classique » ou « *M1-like* », induirait des propriétés cytotoxiques.

- Le type anti-inflammatoire : ce type de réponse, qualifié d'activation « alternative » ou « *M2-like* », implique la surexpression de médiateurs anti-inflammatoires comme le TGF- β , l'IL-4, ou encore l'IL-10. Certains auteurs y distinguent 3 sous-catégories avec le type *M2a-like*, pour lequel la microglie est impliquée dans la réparation et la régénération en exprimant des facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires ; le type *M2b-like*, qui serait un phénotype immunorégulateur, exprimant aussi des facteurs anti-inflammatoires ; et le type *M2c-like*, qui serait un phénotype de « désactivation acquise » et qui participerait à la neuroprotection, notamment par ses fonctions phagocytaires (Hirbec et al. 2019; Zhang, Zhang, and You 2018)

Il est à noter cependant que cette classification, basée sur celles des macrophages, est remise en cause. En effet, elle ne suffirait pas à décrire les multitudes de façons selon lesquelles la microglie répond face aux différents changements de son environnement, ni la diversité de ses fonctions (Hammond, Robinton, and Stevens 2018; Hirbec et al. 2019; Ransohoff 2016).

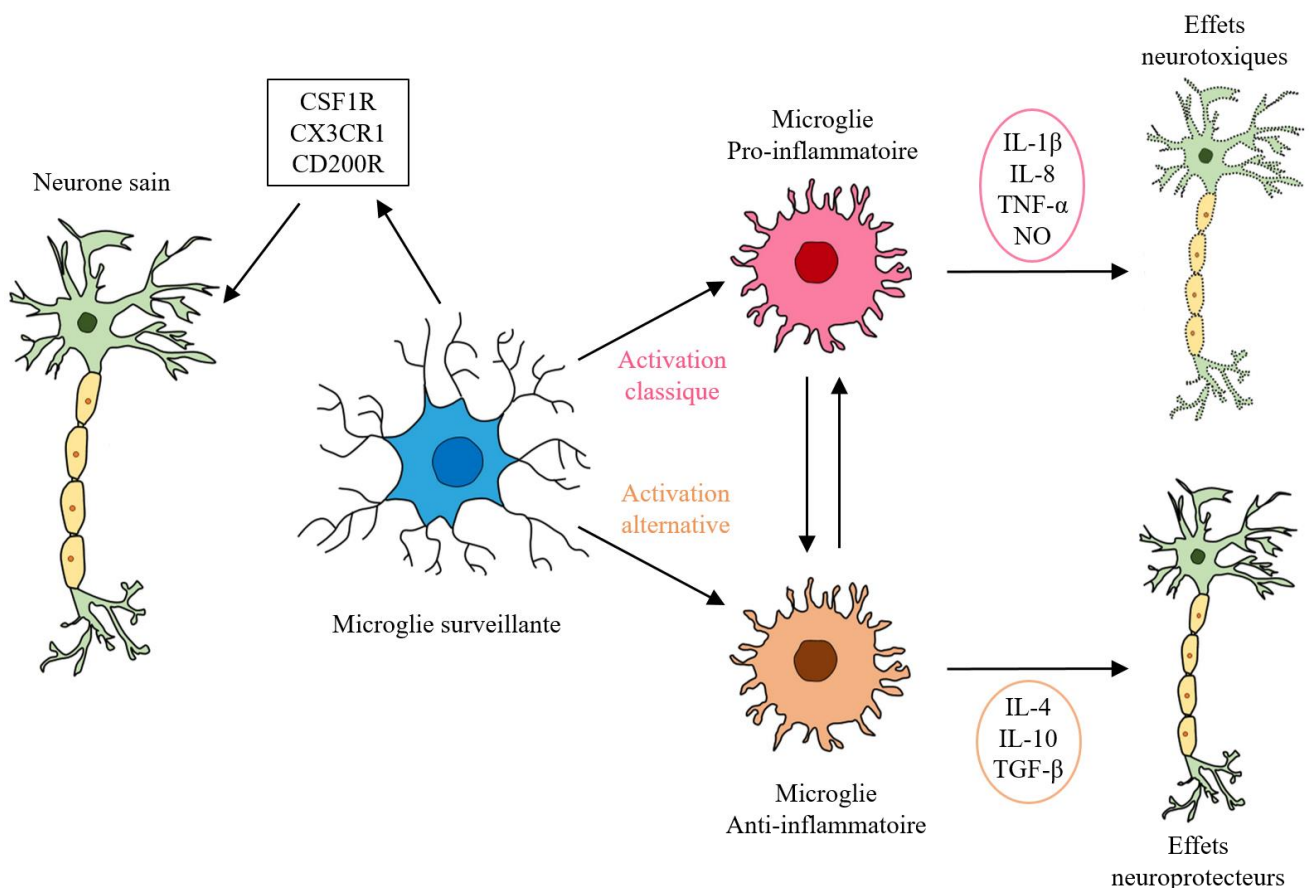


Figure 11 : activation de la microglie

La microglie surveillante, suite à des signaux On/Off peut subir une activation classique ou alternative. Elle peut également passer d'un état pro-inflammatoire à un état anti-inflammatoire et inversement. Suivant le type d'activation, elle exprime différents médiateurs inflammatoires,

qui peuvent avoir des effets neurotoxiques ou neuroprotecteurs. Adapté de Subramaniam and Federoff (2017).

3.6. La microglie dans l'épilepsie

Les cellules microgliales ont également un rôle dans l'ictogénèse et l'épileptogénèse. Elles agiraient principalement au niveau de la neuroinflammation. En effet, il a été montré que la microglie produit des médiateurs pro-inflammatoires dans les 30 minutes suivant le début des crises, et qu'une activation microgliale excessive ou prolongée peut causer des dysfonctionnements et de la mort cellulaires (Devinsky et al. 2013). De plus, la microglie peut également répondre à une inflammation périphérique : dans un modèle d'inflammation périphérique due à une colite chez le rat, il a été montré que l'inflammation périphérique induisait une réponse inflammatoire dans le cerveau, avec notamment des taux de cytokines pro-inflammatoires plus élevés, mais aussi un nombre de cellules microgliales activées plus important. Par ailleurs, la susceptibilité à faire des crises d'épilepsie était corrélée à la sévérité de l'inflammation périphérique et l'administration d'un inhibiteur de l'activation microgliale a permis de diminuer cette susceptibilité (Riazi et al. 2010). Il ressort donc de cette étude qu'une inflammation périphérique induit une réponse inflammatoire « miroir » dans le cerveau, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'excitabilité des neurones. Cette excitabilité peut aussi être expliquée par la diminution de neurones inhibiteurs, induit par la signalétique inflammatoire qui peut promouvoir la perte de neurones GABAergiques.

Suite à la libération de médiateurs pro-inflammatoires, une réponse anti-inflammatoire endogène (sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires et de facteurs de croissance) aide normalement à résoudre la réponse pro-inflammatoire, mais est souvent inefficace lorsque cette inflammation a pour origine une blessure épileptogène (Vezzani, Friedman, and Dingledine 2013). Des traitements anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs pourraient donc permettre d'atténuer la progression des crises spontanées, et ce, même dans le cas de syndromes épileptiques résistants aux médicaments anti-épileptiques conventionnels, en réduisant la quantité de cytokines pro-inflammatoires et en inhibant les réponses astrocytaire et microgliale (Devinsky et al. 2013; D. Li et al. 2012; Shen et al. 2019; Vezzani, Balosso, and Ravizza 2019).

En plus de ce rôle dans la neuroinflammation, il est possible que la microglie ait également un rôle dans l'élagage synaptique, qui, suite à des crises d'épilepsie, devient anormal. Diverses études sur des modèles animaux suggèrent que l'élagage synaptique anormal par la

microglie pourrait induire le déclenchement, mais aussi l'aggravation des crises épileptiques (Andoh, Ikegaya, and Koyama 2019). En effet, un élagage aberrant induirait un déséquilibre de la balance synaptique E/I, déjà identifié comme étant un facteur de risque dans l'ictogénèse. Cependant, il reste à déterminer si la microglie privilégie un type de synapses à phagocyter plutôt qu'un autre, et par quel mécanisme cette préférence est faite si c'est le cas (Andoh et al. 2019).

IV. Le poisson zèbre

4.1. Généralités

Le poisson zèbre est un animal faisant partie de l'infra-classe des téléostéens, qui représente une écrasante majorité des espèces de poissons téléostéens (plus de 96%), et près de la moitié des espèces de vertébrés (plus de 70 000 à ce jour (IUCN 2021)). Les téléostéens ont subi une duplication entière du génome (WGD, pour *Whole Genome Duplication*), qu'on appelle la *teleost-specific WGD* (TS-GWD), ce qui a donné naissance à de nombreux gènes paralogues. Initialement, ces paralogues sont identiques et donc fonctionnellement redondants, ce qui en a fait des cibles particulièrement intéressantes pour fournir le matériel génétique nécessaire à l'innovation évolutive : les paralogues issus d'une WGD sont appelés des ohnologues (d'après la théorie de Susumo Ohno). Un des duplicats peut ainsi acquérir une nouvelle fonction : c'est la néofonctionnalisation (Glasauer and Neuhauss 2014; Ohno 1970). Cet événement de l'évolution des téléostéens est probablement à l'origine du fait que le poisson zèbre a plus de gènes que n'importe quel autre vertébré déjà séquencé, avec 26 206 gènes codants (Howe et al. 2013).

Le poisson zèbre, de son nom binominal *Danio rerio*, est, comme son nom l'indique, un petit poisson rayé. Dans son milieu naturel, c'est un poisson tropical d'eau douce originaire d'Asie du Sud (Inde, Bangladesh et Népal principalement). On le retrouve souvent dans des eaux calmes ou stagnantes, dans une gamme de température très large, allant de 6°C en hiver, à 38°C en été. Il est omnivore, son régime alimentaire consistant majoritairement de zooplanctons et d'insectes, et est grégaire : là où on trouve des poissons zèbres, ils tendent à être l'une des espèces les plus représentées (Spence et al. 2008).

4.2. Développement général du poisson zèbre

Le poisson zèbre se développe selon 5 stades successifs : l'embryon, l'éléuthéro-embryon, la larve, le juvénile, et enfin l'adulte (**Figure 12**).

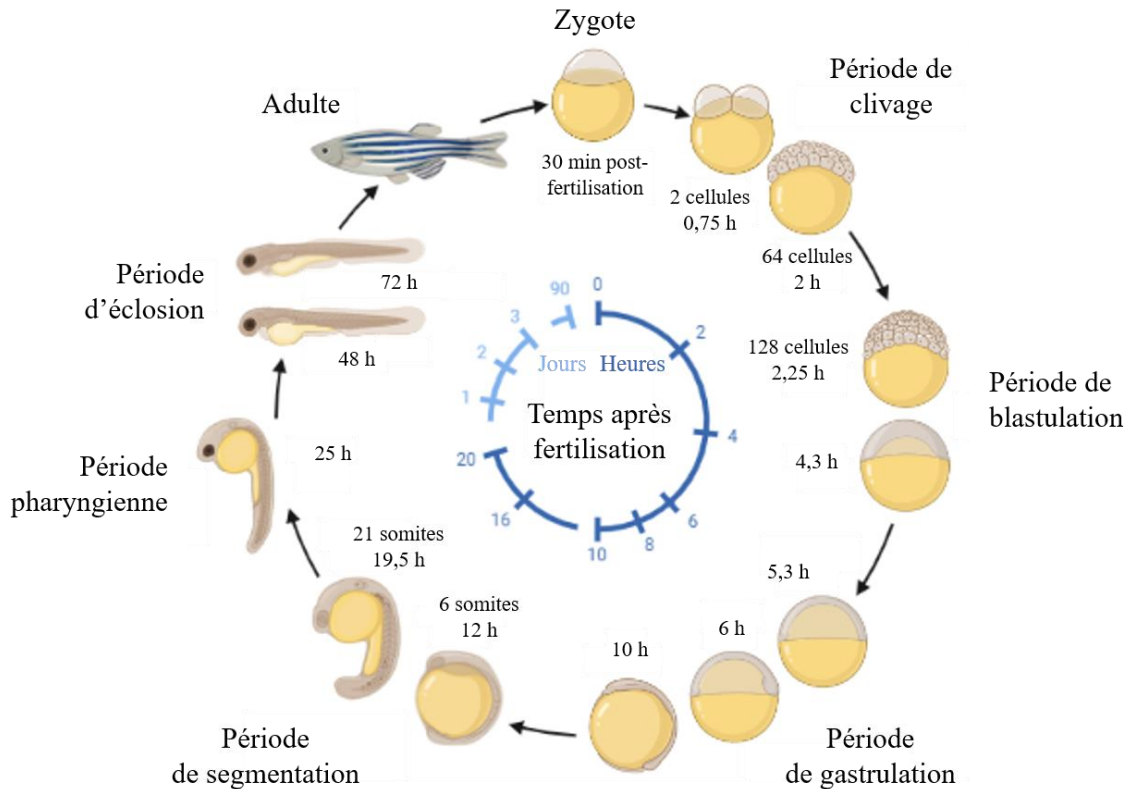


Figure 12 : développement embryonnaire du poisson zèbre

Traduit de "Zebrafish Developmental Timeline", créé par BioRender, Janvier 2020. Copyright 2021 par BioRender.

Le stade embryonnaire couvre la période allant de 0 à 48-72 heures post-fécondation (hpf). Une fois que le gamète de la femelle est fécondé par le gamète du mâle, le zygote va subir une première division cellulaire pour obtenir 2 cellules (0 – 0,75 hpf). Une seconde division cellulaire lui permet d'atteindre 4 cellules et d'entrer dans la période de clivage (0,75 – 2,25 hpf, jusque 64 cellules), durant laquelle les cellules se divisent toutes les 15 minutes en moyenne. S'ensuit la période de blastulation (2,25 – 5,25 hpf), de gastrulation (5,25 – 10 hpf), puis la période de somitogenèse (10 – 24 hpf) durant laquelle les ébauches des premiers organes deviennent visibles. On peut ainsi distinguer le développement des somites et le bourgeon caudal, les premiers mouvements apparaissent et l'embryon s'allonge. L'embryon rentre ensuite dans la période pharyngienne (« *pharyngula period* », 24 – 48 hpf), qui désigne la période pendant laquelle on observe le stade phylotypique du développement, c'est-à-dire la

période où l'embryon possède un plan d'organisation caractéristique des vertébrés. Finalement, il atteint la période d'éclosion (48 – 72 hpf) durant laquelle il continue de grandir et finit par sortir de son chorion. Une caractéristique importante de cette étape est le repositionnement de la bouche : cette dernière, qui possède initialement une position ventrale, progresse vers l'avant de la tête, pour finalement être proéminente.

Le stade éléuthéro-embryonnaire commence juste après l'éclosion (entre 48 et 72h post-fécondation) et dure jusqu'à la fin de la résorption de la vésicule vitelline, qui constituait jusqu'alors la réserve d'auto-alimentation, ce qui marque également le début de l'alimentation exogène (Naudin 1996).

Le stade larvaire prend ensuite le relai jusqu'aux environs des 30 jpf. Durant cette période, la larve de poisson zèbre continue de se développer. Notamment, la vessie natatoire, l'organe permettant au poisson de se déplacer en profondeur, devient opérationnelle. Les larves deviennent plus mobiles et le caractère prédateur pour se nourrir se met en place. Le passage du stade larvaire au stade juvénile se caractérise par la métamorphose, un ensemble de changements morphologiques qui inclut la perte totale du repli médian, le remodelage du système digestif et du système nerveux entre autres, ainsi que l'acquisition de nouvelles caractéristiques de l'adulte comme l'apparition des écailles (Parichy et al. 2009).

Après la métamorphose, le poisson est considéré comme juvénile. Ce stade juvénile s'étend de 1 à 3 mois post-fécondation. Le poisson développe alors complètement ses nageoires et ses écailles (de Abreu et al. 2020; Kimmel et al. 1995). C'est à ce stade qu'il commence à se différencier sexuellement. En effet, toutes les larves de poisson zèbre développent initialement des ovocytes, dès 13 – 14 jpf, se développant ainsi selon un mode de type femelle, peu importe le sexe final du poisson. Les premiers signes de différenciation sexuelle commencent dans les alentours de 20 – 25 jpf, période concordant avec celle de la métamorphose et durant laquelle ils transitionnent : les poissons qui seront femelles continuent de développer des gonades femelles, tandis que les ovocytes des poissons destinés à devenir des mâles rentrent en apoptose (Uchida et al. 2002). Bien qu'il semblerait que la détermination sexuelle soit terminée vers 30 jpf, il n'est pas possible de distinguer le sexe d'un poisson sur des critères externes avant que le poisson ait atteint le stade adulte (à partir de 3 mois post-fécondation), qui se caractérise par l'atteinte de la maturité sexuelle, avec la production de gamètes viables, et la capacité de s'accoupler. Il est également à noter que la température de l'eau à cette période peut avoir une incidence sur la détermination du sexe des poissons. En effet, une température basse (~ 22°C)

favorise la production de mâles, tandis qu'une température plus élevée (~ 31°C) favorise la production de femelles (Sfakianakis, Leris, and Mylonas 2012).

Il existe 3 critères de dimorphisme sexuel principaux, permettant ainsi de différencier un mâle d'une femelle : (1) la morphologie des mâles est plutôt élancée, tandis que les femelles ont un abdomen plus large dû au fait que les ovaires sont significativement plus volumineuses que les testicules ; (2) la nageoire anale des mâles apparaît plus jaune que celle des femelles, dû à une production plus importante de pigments jaunes ; (3) l'orifice génital des femelles présente des stries longitudinales et est protubérant, tandis que celui du mâle ne l'est pas (**Figure 13**) (Kossack and Draper 2019).

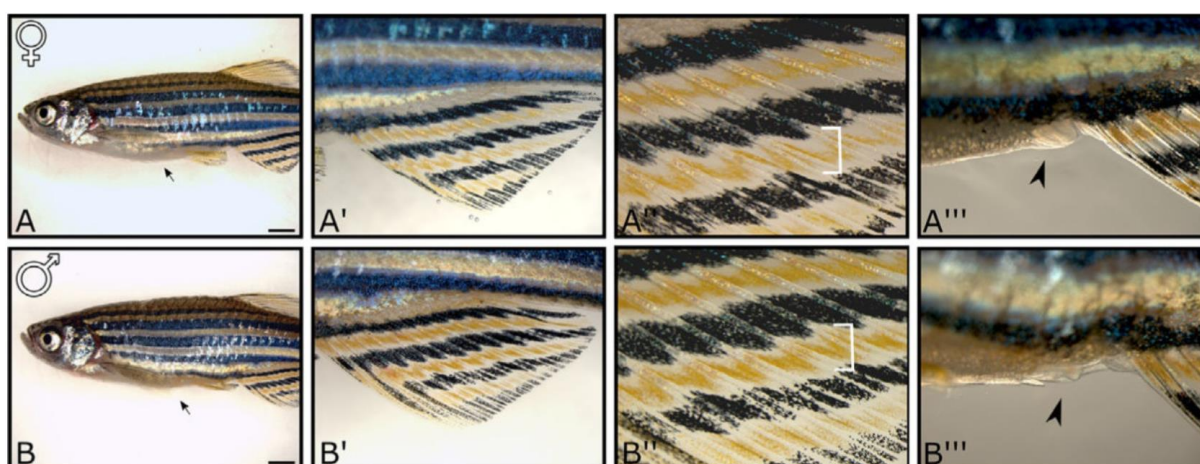


Figure 13 : dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre

Poissons zèbres femelle (A–A''') et mâle (B–B''') âgés de 6 mois. La femelle (A) a un abdomen plus important que le mâle (B), montré par la flèche. La nageoire anale est plus jaune chez le mâle (B'–B'') que la femelle (A'–A''), comme montré par les crochets. Enfin, l'orifice génital de la femelle (A''') est protubérant, contrairement à celui du mâle (B'''). Tiré de Kossack and Draper (2019)

4.3. Développement cérébral et colonisations microgliales

Le système nerveux du poisson zèbre se forme très rapidement. En effet, la formation du SNC du poisson zèbre commence très tôt, avec un début de formation neuronale dès 16 hpf. À partir de 17 hpf, les différentes sous-régions du cerveau du poisson zèbre commencent à se former, avec notamment le cervelet, le thalamus et la *midbrain-hindbrain boundary* (MHB), qui sépare le mésencéphale (cerveau moyen) du rhombocéphale (cerveau postérieur) (Coolen and Bally-Cuif 2008). Dès 18 hpf et jusqu'aux environs de 32 hpf, le système de signalisation

neurale commence à se mettre en place avec les systèmes GABAergiques et glutamatergiques notamment. À 20 hpf, la BHE commence à se constituer, notamment avec la mise en place de la vascularisation cérébrale, avec un début d'angiogenèse entre 28 et 32 hpf. À 72 hpf, la BHE a commencé à s'établir de telle sorte qu'elle est imperméable à certaines molécules utilisées en tant que traceurs (protéines fluorescentes par exemple), mais est encore immature (Fleming, Diekmann, and Goldsmith 2013; Jeong et al. 2008; Quiñonez-Silvero, Hübner, and Herzog 2020; Xie et al. 2010). Une étude par Fleming, et al. (2013) a permis de démontrer par microscopie électronique en transmission, utilisation de marqueurs fluorescents, et spectrométrie de masse entre autres, que la maturation de la BHE se produit entre 3 jpf et 10 jpf, devenant ainsi moins perméable. Il a par ailleurs également été montré que la BHE du poisson zèbre ressemble à la BHE des mammifères, tant sur un plan structurel que fonctionnel (Fleming et al. 2013; Jeong et al. 2008). Les macrophages ayant commencé à coloniser le cerveau vers 35 hpf ont eux terminés de se différencier en cellules microgliales vers 72 hpf (de Abreu et al. 2020).

L'origine développementale de la microglie durant l'embryogenèse est controversée. Bien qu'elle ait initialement été décrite comme d'origine neuroectodermique, de récents travaux suggèrent fortement qu'elle serait en fait d'origine hématopoïétique (Prinz, Jung, and Priller 2019). Chez la souris, des études ont permis de déterminer que les cellules microgliales qui colonisent le cerveau pendant le développement persistent tout au long de leur vie. Ce n'est pas le cas du poisson zèbre, pour lequel il existe 2 vagues de colonisation : une première pendant le développement, qui va se faire entièrement remplacer par la seconde vague, qui prend le relais pendant le stade juvénile et qui est définitive (Ferrero et al. 2021). Cependant, la colonisation du cerveau en développement du poisson zèbre par les cellules microgliales se fait de façon très similaire à celle des mammifères, suggérant ainsi que les avancées dans ce domaine faites dans le poisson zèbre sont probablement applicables aux mammifères (J. Xu et al. 2016). De plus, l'étude de l'expression des gènes microgliaux a montré que la microglie du poisson zèbre au stade larvaire possède un nombre significatif de gènes exprimés en commun avec la microglie du poisson zèbre au stade adulte, mais aussi avec la microglie de la souris adulte et la microglie humaine (Mazzolini et al. 2020).

4.3.1. Première vague : la microglie embryonnaire

Les études des dernières décennies ont montré que, comme chez les mammifères, le poisson zèbre subit des vagues successives d'hématopoïèse et produit des cellules sanguines

matures semblables à celles des mammifères. Chez le poisson zèbre, la première vague d'hématopoïèse, l'hématopoïèse primitive, commence vers 11 hpf dans deux régions différentes : le mésoderme latéral postérieur (PLM) et l'îlot sanguin rostral (RBI, pour *rostral blood island*). C'est cette dernière région, équivalente au sac vitellin chez la souris, qui produit les cellules myéloïdes qui vont contribuer à la formation, entre autres, des macrophages primitifs (Xu et al. 2015). Ces macrophages primitifs, qui émergent donc du RBI, vont dans un premier temps migrer vers le sac vitellin vers 30 hpf, puis vont migrer dans un second temps vers le cerveau via deux voies principales, vers 35 hpf. La majorité de ces cellules, environ 59%, va entrer directement dans la région ventrale latérale du tectum optique en passant par la périphérie bilatérale entre les yeux et le cerveau, probablement le long de la couche de méninge. L'autre partie, environ 34%, passe par la partie ventrale du cerveau. Occasionnellement, quelques macrophages primitifs (~ 7%) ont été observés en train d'entrer dans le tectum optique par la périphérie dorsale du cerveau (**Figure 14**) (J. Xu et al. 2016). Cette colonisation du cerveau par les macrophages primitifs, contrairement à ce qui a été suggéré chez la souris (Ginhoux et al. 2010), se fait de façon indépendante de la circulation sanguine. De plus, elle est promue par la mort neuronale qui a lieu naturellement lors de la neurogenèse. En particulier, Xu et al. (2016) ont montré que l'ATP relargué par les neurones mourants ne semblait pas être un médiateur chimioattractant pour la colonisation du cerveau en développement par les macrophages primitifs, bien qu'il ait un rôle important dans l'activation et la migration de la microglie. En revanche, la lysophosphatidylcholine (LPC), un phospholipide connu pour être sécrété par les cellules apoptotiques et ayant déjà montré un rôle chimioattractif pour la migration des macrophages (Lauber et al. 2003), semble elle, avoir un effet attractif. Ils ont ainsi montré que la colonisation était régulée, au moins en partie, par la voie de signalisation LPC-G2A, G2A étant un récepteur de la microglie couplé à une protéine G, dont l'équivalent chez le poisson zèbre est *gpr132b*. Par ailleurs, il a également été montré que cette première vague de colonisation microgliale se faisait de façon dépendante de *pu.1* mais indépendante de *runx1* et *cmyb* (Ferrero et al. 2018; Xu et al. 2015).

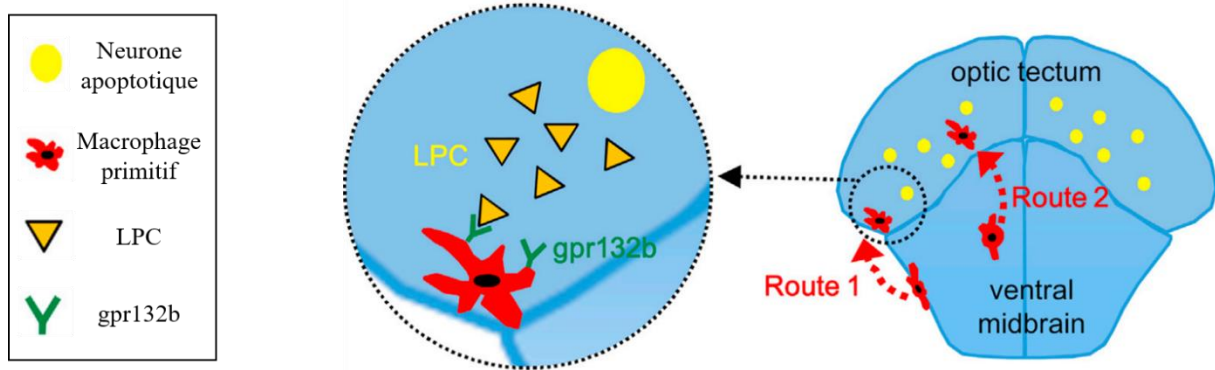


Figure 14 : entrée des macrophages primitifs dans le cerveau du poisson zèbre par 2 voies distinctes

Tiré de J. Xu et al., 2016

À ce stade, les macrophages primitifs, précurseurs microgliaux, expriment des marqueurs typiques des macrophages tels que *mfap4*, *mpeg1* ou encore *lcp1* (Kell et al. 2018; Walton et al. 2015). Comme chez la souris, ils sont d'abord de morphologie plutôt amiboïde, puis se différencient en cellules microgliales ramifiées vers 60 hpf (Herbomel, Thisse, and Thisse 2001). Cette différenciation de macrophages primitifs en cellules microgliales se caractérise notamment par l'expression de gènes spécifiques de la microglie tels qu'*apoeb* (apolipoprotéine Eb) et *p2ry12*.

Ainsi, malgré la controverse autour de l'origine de la microglie embryonnaire, les récentes études penchent de plus en plus vers une origine hématopoïétique. Une étude a d'ailleurs montré que les macrophages primitifs sont très probablement l'unique source de la microglie embryonnaire chez le poisson zèbre. En effet, les hypothèses selon lesquelles la microglie serait dérivée directement de progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) ou de cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont peu probables. De fait, le potentiel de différenciation des EMP dans les embryons *tfec*^{null} est altéré et les embryons *cmyb*^{null} sont complètement dépourvus de HSC, mais dans les deux cas, on retrouve un nombre de cellules *apoeb*⁺ semblable à celui des embryons contrôles à 4 jpf. De plus, Ferrero et al. (2018) ont utilisé une lignée portant le transgène *mpeg1:Kaede*, codant pour un fluorophore photoconvertible du vert au rouge sous le contrôle du promoteur *mpeg1*, qui est spécifique des macrophages. Entre 26 et 28 hpf, période pendant laquelle *kaede* n'est exprimé que par les macrophages primitifs, les embryons *Kaede*⁺ sont photoconvertis et une analyse par cytométrie de flux est réalisée à 72 hpf, période à laquelle la différenciation en microglie a déjà eu lieu. Les cellules sont triées à la sortie de la cytométrie de flux et une qPCR réalisée sur les cellules *Kaede*⁺ rouges a permis de déterminer la présence des transcrits *apoeb* et *csflra*, spécifiques de la microglie (Figure 15).

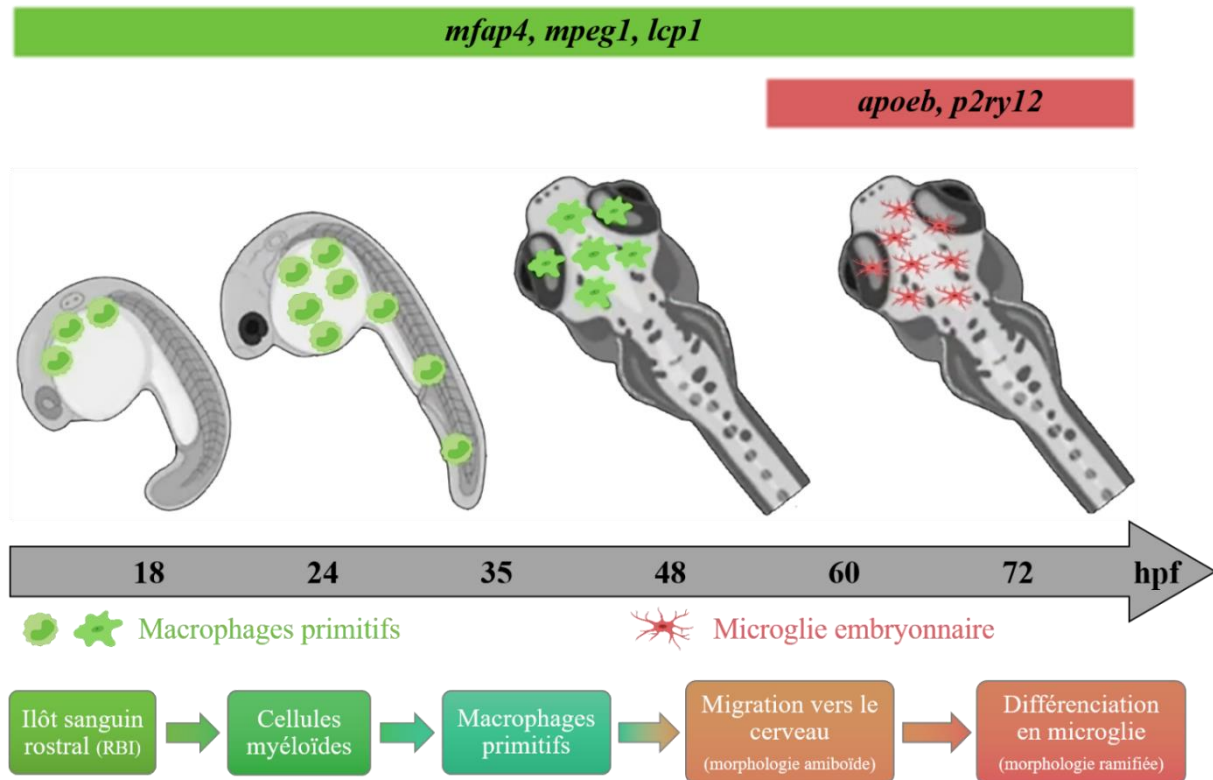


Figure 15 : colonisation du cerveau du poisson zèbre par des macrophages primitifs et différenciation en microglie

Les macrophages primitifs émergent du RBI vers le sac vitellin pour ensuite migrer jusqu'au cerveau, où ils se différencient en microglie. Cette différenciation est marquée notamment par l'apparition de marqueurs spécifiques de cette population comme *apoeb* et *p2ry12*. Schéma adapté de la présentation de Ferrero et al., lors du congrès Zebrafish 2020.

4.3.2. Deuxième vague : la microglie définitive

La deuxième vague d'hématopoïèse survient vers 26 – 28 hpf et a pour origine la paroi ventrale de l'aorte dorsale (VDA, pour *ventral wall of dorsal aorta*), tissu dont l'équivalent chez la souris est également un site hématopoïétique. Cette deuxième vague d'hématopoïèse produit des HSC qui sont par la suite capables de donner naissance à des cellules sanguines matures, mais aussi à des cellules microgliales adultes et définitives. Bien que cette deuxième vague ait lieu peu de temps après la première et que la différenciation des HSC se fait aux alentours de 60 hpf, le remplacement de la microglie embryonnaire par la microglie définitive ne se fait qu'à partir de 15 – 20 jpf. Leur activité entre ces deux périodes du développement n'est pas encore connue. Les cellules microgliales définitives, dérivées du VDA, commencent donc à coloniser le cerveau du poisson zèbre et à remplacer la microglie embryonnaire, dérivée du RBI, à partir de 15 – 20 jpf. Leur nombre augmente rapidement jusqu'à devenir la population

dominante à 3 mois post-fécondation. À 1 an, la microglie originaire du RBI n'est plus détectable et a donc été entièrement remplacée.

Contrairement à la première colonisation microgliale, cette deuxième colonisation se fait de façon indépendante de *pu.1* mais dépendante de *runx1* et *cmyb* (Ferrero et al. 2018; Xu et al. 2015) (**Figure 16**).

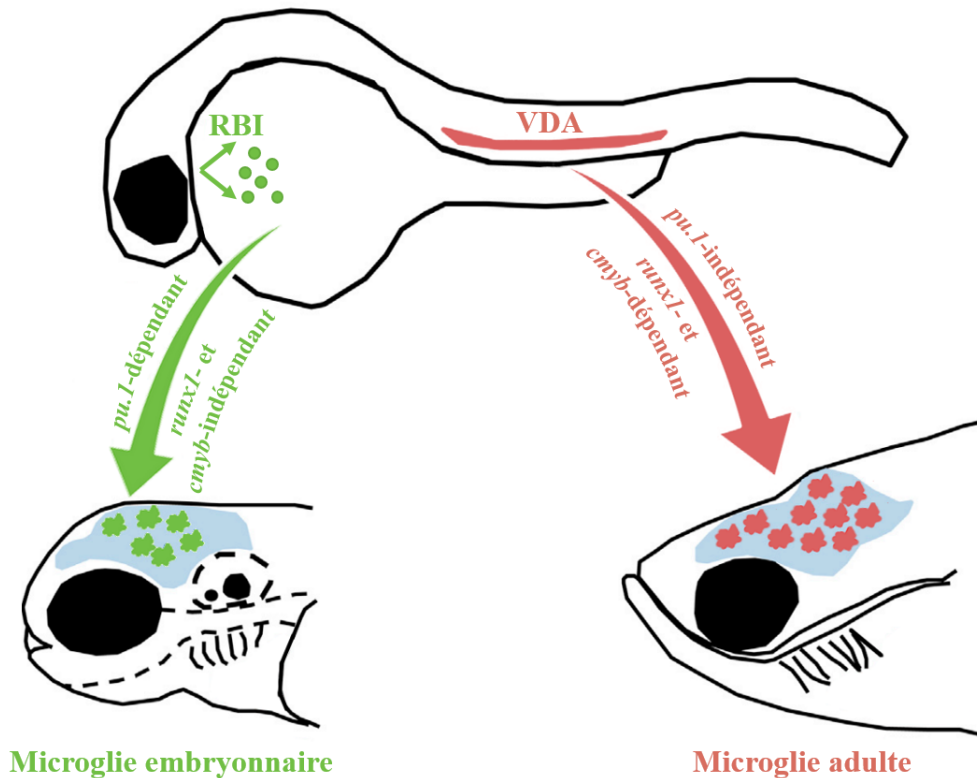


Figure 16 : origines distinctes de la microglie embryonnaire et adulte chez le poisson zèbre
La microglie embryonnaire a pour origine l'îlot sanguin rostral (RBI) et est indépendante de la voie *pu.1* mais dépendante de celles de *runx1* et *cmyb*, contrairement à la microglie adulte, qui provient de la paroi ventrale de l'aorte dorsale (VDA). Adapté de Xu et al. (2015).

4.4. Un modèle animal de choix

Le poisson zèbre en tant qu'animal de laboratoire apparaît en 1972 grâce à George Streisinger, considéré comme le père fondateur de la recherche sur le poisson zèbre, qui s'intéressait à la génétique et au développement des vertébrés (Varga 2016). À cette époque, le poisson zèbre en tant que modèle ne fait qu'émerger, avec seulement quelques articles publiés chaque année. C'est à partir des années 1990 qu'on observe un intérêt croissant, avec des dizaines de publications par an et même la création en 1994 d'une base de données génétiques

et génomiques, le *Zebrafish Information Network* (ZFIN) (Ruzicka et al. 2019), jusqu'à atteindre presque 3 000 publications annuellement en 2016 (Shams et al. 2018).

En 2001, le Wellcome Sanger Institute lance le *Zebrafish Genome Project* qui a pour but de séquencer le génome entier du poisson zèbre en utilisant comme référence la lignée Tübingen (TU). La description du génome de cette lignée a été publiée en 2013 et a permis d'établir la proportion d'homologie entre les gènes de l'Homme et ceux du poisson zèbre. Ainsi, 71,4% des gènes humains ont un orthologue chez le poisson zèbre et 82% des gènes humains impliqués dans des morbidités ont un orthologue chez le poisson zèbre (Howe et al. 2013). Le poisson zèbre possède donc une forte homologie génétique avec l'Homme, mais aussi une forte homologie physiologique, notamment au niveau du cerveau, de la musculature, du système vasculaire ou encore du système immunitaire inné (Zhao, Huang, and Ye 2015).

En tant que modèle vertébré, le poisson zèbre présente de nombreux avantages :

- (i) Sa grande fertilité et fécondité : elle permet de récupérer des centaines d'embryons à chaque ponte, ce qui est idéal pour des études en génétique ou pour faire du criblage à haut débit par exemple.
- (ii) Son développement embryonnaire : il est externe, ce qui lui permet d'être étudié facilement, mais est aussi très rapide, ce qui permet d'obtenir des larves suffisamment développées (nage libre, développement du SNC bien avancé, etc.) assez rapidement.
- (iii) La transparence des larves : les larves de poisson zèbre sont complètement transparentes jusqu'à environ 1 – 2 jpf, délai qui peut être allongé jusqu'au moins 7 jpf en utilisant des inhibiteurs de synthèse de la mélanine, comme le phénylthiourée (PTU) (Antinucci and Hindges 2016). Cette transparence, combinée à des techniques d'imagerie par fluorescence, ouvre une multitude de possibilités pour le domaine de la recherche. Il est à noter cependant que le PTU peut avoir des effets secondaires, et donc des effets sur les résultats obtenus (Chen et al. 2021; Z. Li et al. 2012).
- (iv) La modification génétique : de nombreuses techniques de modification génétique existent pour le poisson zèbre pour réaliser le *knockdown* d'un gène de façon transitoire, avec l'injection de morpholino (oligonucléotide antisens),

ou permanente, avec par exemple l'utilisation de nucléases à doigt de zinc (ZFNs, pour *Zinc Finger Nuclease*), de nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs, pour *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*), ou encore de la technologie CRISPR-Cas9. Ainsi, de nombreuses lignées transgéniques exprimant des marqueurs fluorescents et de nombreux mutants ont été créés et ont contribué à la recherche dans des domaines divers et variés comme le domaine du cancer (Ignatius and Langenau 2011), de l'immunologie (Trede et al. 2004), ou encore des neurosciences (Cong et al. 2017; Higashijima et al. 2003). Par ailleurs, il existe notamment la lignée *casper* dont la mutation des gènes *roy* et *nacre*, entraînant respectivement une absence d'iridophores et de mélanocytes (White et al. 2008), rend les poissons transparents, permettant ainsi l'imagerie *in vivo* au stade adulte (**Figure 17**).

- (v) Sa taille : elle permet un élevage conséquent, pour un coût de maintenance raisonnable, que ce soit en termes d'installations ou de nourriture.

Ces nombreux avantages, couplés à l'homologie génétique et physiologique avec l'Homme, font du poisson zèbre un excellent compromis entre la complexité du système et la simplicité de la pratique.

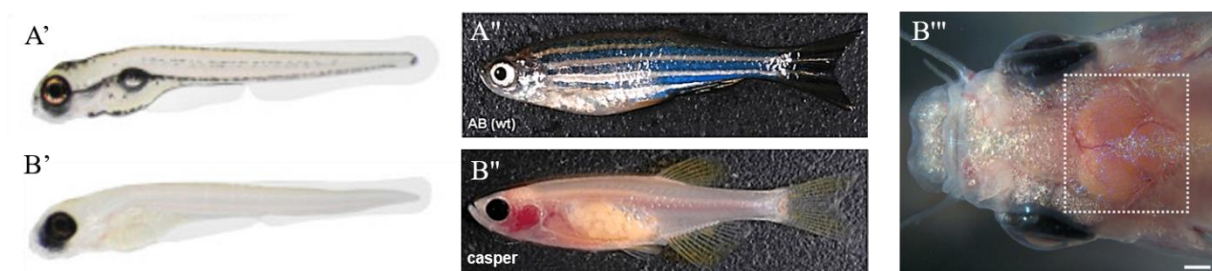


Figure 17 : transparence de la lignée *casper*

Forme larvaire (A') et adulte (A'') d'un poisson zèbre de la lignée sauvage AB. Forme larvaire (B') et adulte (B'') d'un poisson zèbre de la lignée mutante *casper*, rendant le poisson transparent. (B''') Vue dorsale de la tête d'un poisson *casper* adulte, laissant apparaître le cerveau (en pointillés blancs), tiré de Castranova *et al.* (2021). Photos des larves tirées de D'Agati *et al.* (2017), photos des poissons adultes tirées de White *et al.* (2008).

4.5. Intérêt pour cette étude

L'intérêt du poisson zèbre pour mon projet de thèse repose sur 2 éléments principaux. Le premier est la formation rapide de son système nerveux. Ce développement rapide, couplé à une forte homologie physiologique, rend le poisson zèbre pratique et pertinent pour le deuxième élément d'intérêt, qui est la visualisation et l'étude par fluorescence *in vivo* des cellules microgliales et des crises épileptiformes induites par le DFP. La visualisation de la microglie est possible grâce à une lignée transgénique qui marque les macrophages et la microglie, et la visualisation des crises épileptiformes induites par le DFP est possible grâce à l'utilisation d'une lignée transgénique exprimant un bio-senseur fluorescent sensible aux ions calciques dans les neurones. Cela permet d'observer l'activité calcique neuronale, qui a déjà été corrélée à l'activité électrique du cerveau (Brenet et al. 2019; Liu and Baraban 2019).

Par ailleurs, de façon plus générale, il est intéressant de noter l'apport du poisson zèbre à l'étude de l'épilepsie. En effet, bien que ce modèle n'ait commencé à être utilisé que tardivement comparé aux modèles mammifères (Yaksi et al. 2021), celui-ci a pourtant déjà fait preuve de son potentiel, avec des contributions significatives pour notre compréhension de l'épilepsie et le développement de traitements. Ainsi, de nombreux modèles d'épilepsie ont été développés en utilisant le poisson zèbre, comme par exemple des modèles d'épilepsie induite par un traumatisme, une tumeur ou encore une neurodégénérescence, mais aussi des modèles d'épilepsie génétique (Baraban, Dinday, and Hortopan 2013; Cho et al. 2020; Ekker 2021; Wager et al. 2016). Une étude récente sur le poisson zèbre a notamment permis de montrer qu'un traumatisme cérébral dans le télencéphale adulte pouvait induire l'épileptogenèse, avec des crises spontanées associées à de la neuroinflammation et des dommages de la BHE (Cho et al. 2020). D'autres études ont permis d'identifier des molécules d'intérêt pharmacologique pour le traitement des épilepsies. En effet, le criblage phénotypique de molécules à haut débit sur un modèle du syndrome de Dravet, une épilepsie sévère du nourrisson causée dans la majorité de cas par une mutation du gène *SCN1A* (Dravet 2011), a par exemple permis l'identification de molécules qui permettaient de diminuer l'augmentation de la locomotion observée, associée à la mutation *scn1lab* (orthologue de *SCN1A* chez le poisson zèbre). Certaines de ces molécules (clemizole, fenfluramine, lorcaserin) sont d'ailleurs aujourd'hui en phase d'essais cliniques en tant que traitement pour contrecarrer les crises d'épilepsie chez l'Homme (Baraban et al. 2013; Griffin et al. 2017, 2018; Griffin, Krasniak, and Baraban 2016), soulignant ainsi le grand potentiel de ce modèle et de cette approche.

4.6. Limitations du modèle animal

Tout modèle animal possède ses limitations. Dans le cas du poisson zèbre, les progéniteurs microgliaux de ce dernier n'ont pas besoin de la circulation sanguine pour migrer vers le cerveau, contrairement à ce qui est observé chez la souris, qui est phylogénétiquement plus proche de l'Homme (Ginhoux and Prinz 2015). De plus, les cellules microgliales ne sont pas tout de suite définitives chez le poisson zèbre, puisqu'une deuxième vague microgliale remplace complètement la première. En outre, on sait que chez l'Homme, la microglie émerge dans les alentours de la 13^{ème} semaine de gestation, mais peu d'éléments supplémentaires concernant son développement sont connus, ce qui rend une comparaison avec les différents modèles animaux existants difficile.

Le poisson zèbre en tant que modèle animal possède quelques autres désavantages comme la divergence génétique au cours du temps, avec un ancêtre commun à l'Homme remontant à 445 millions d'années contre 96 millions pour les rongeurs. En plus d'être un animal à sang froid, une physiologie différente des humains, d'autres différences d'ordre anatomique existent, ce qui rend certains troubles ou maladies difficiles voire impossible à modéliser dans cette espèce (Ali et al. 2011). Enfin, la duplication de son génome entier (TS-GWD) a pour conséquence que beaucoup d'orthologues aux gènes humains sont présents en 2 copies, générant un effort supplémentaire dans la détermination du rôle fonctionnel de chacun (Ali et al. 2011).

Malgré tout, le poisson zèbre possède de nombreux avantages et sa popularité est grandissante. Par la suite, il faudra évidemment combiner les résultats obtenus sur le poisson zèbre avec ceux obtenus sur d'autres modèles animaux et *in vitro* avant de pouvoir les extrapoler à l'Homme.

Objectifs

L'intoxication aux organophosphorés (OP) est un problème de santé publique. Ces intoxications peuvent être dues à une exposition chronique dans le cas des professions agricoles, ou aiguë dans le cas d'une attaque terroriste par exemple. Les traitements actuels contre l'intoxication aiguë n'ont que peu, voire pas du tout évolué durant les 40 dernières années. Cependant, ces traitements ont certaines limites. Notamment, les oximes sont inefficaces contre les effets induits par les OP cholinergiques sur le SNC du fait du non passage de la BHE par ces dernières. Les limitations de ces traitements appellent donc à la recherche de nouvelles voies thérapeutiques. Pour cela, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'intoxication aiguë aux OP. Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de la microglie. En effet, il a été suggéré dans de récentes études que la microglie avait un potentiel rôle dans l'aggravation des crises d'épilepsie induites par une intoxication aux OP, notamment de par sa contribution à la réponse inflammatoire. Pour étudier la microglie dans ce contexte, nous avons exploité les avantages du modèle de poisson zèbre. En effet, ce petit vertébré facilite la visualisation *in vivo* des modifications cellulaires et moléculaires grâce à des lignées transgéniques, permettant ainsi d'observer ces changements en temps réel par microscopie à fluorescence.

Les objectifs de ce travail étaient donc de :

- 1) Mettre au point un modèle d'intoxication aiguë à un organophosphoré, le DFP, en utilisant le poisson zèbre
- 2) Utiliser ce modèle pour étudier la microglie, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans un contexte d'intoxication aiguë à un OP

Chapitre 2 :

Matériel et méthodes

Cette section reprend les techniques utilisées pour l'étude de la microglie (chapitre 4). Celles utilisées pour l'établissement du modèle (chapitre 3) sont décrites dans les articles du chapitre en question.

I. ÉLEVAGE DES POISSONS ZÈBRE

1.1. Conditions d'élevage

Les poissons zèbre élevés au sein de l'animalerie de l'unité 1141 de l'INSERM sont maintenus dans un cycle jour/nuit de 12 heures et dans une eau dite de poisson, ou *fish water* (FW), composée de chlorure de sodium (NaCl, 5 mM), de chlorure de potassium (KCl, 0,17 mM) et de dichlorure de calcium (CaCl₂, 0,33 mM), dissous dans de l'eau distillée (conductance : ~ 11 µS/cm). Cette eau est thermorégulée entre 25°C et 27°C et les paramètres sont relevés 2 fois par semaine afin de vérifier que le pH (6,8 – 7,2) et les taux de nitrates (5 – 10 mg/L) et de nitrites (< 0,025 mg/L) soient corrects.

Les poissons sont nourris 3 fois par jour. Les larves, les juvéniles et les jeunes adultes (jusqu'à ~1,5 an) sont nourris avec des paramécies et les poissons plus âgés sont nourris en alternant paramécies et nourriture lyophilisée (Zebrafeed[®], de Sparos).

1.2. Reproduction

Les expériences sont réalisées sur les larves, il est donc nécessaire de faire de la reproduction afin d'obtenir des embryons. Pour cela, la veille de la récolte des œufs, on place dans l'après-midi des bacs contenant des billes, dans lesquels les œufs fécondés vont tomber, empêchant ainsi d'être mangés par les adultes (Westerfield 2000). Le jour de la récupération des œufs, on récupère le bac de billes et on filtre l'eau. On retire ainsi les billes dans un premier temps, puis le 2^{ème} filtre retient les embryons, qu'on transfère dans une boîte de Petri contenant de la FW supplémentée par du bleu de méthylène (0,02‰), qui possède des propriétés fongicides et bactéricides. Les boîtes de Petri sont ensuite placées dans un incubateur à 28,5°C. La FW supplémentée de bleu de méthylène est ensuite remplacée par de la FW simple à partir de 2 jpf. Lorsque nécessaire, notamment pour les études par microscopie à fluorescence, 0,03 g/L de PTU (soit une concentration de 200 µM) sont ajoutés dans l'eau des poissons à partir de 1 jpf, et renouvelés chaque jour, afin d'inhiber la pigmentation des embryons et ainsi maintenir leur transparence.

1.3. Lignées utilisées

Ce projet de thèse a nécessité l'utilisation de deux lignées principales. En premier lieu, j'ai utilisé la lignée Tg(HuC:GCaMP5G) qui exprime un senseur au calcium Ca^{2+} dans les neurones, ce qui permet de visualiser l'activité calcique neuronale (Hudson 2018). En effet, les neurones des poissons de cette lignée expriment la calmoduline et la GFP (*Green Fluorescent Protein*). En l'absence de Ca^{2+} , la GFP n'est pas fluorescente car elle est sous forme protonée. Lorsqu'un ion Ca^{2+} se lie à la calmoduline, cette dernière change de conformation et permet à la GFP de se déprotoner. La GFP se trouve alors sous forme anionique, qui est fluorescente.

La deuxième lignée utilisée est la lignée Tg(mpeg1:mCherryF). Les macrophages et cellules microgliales des poissons de cette lignée expriment une protéine membranaire rouge, ce qui permet la visualisation de la microglie entre autres (Ferrero et al. 2020).

II. ABLATION DE LA MICROGLIE PAR MICROINJECTION DE MORPHOLINO

L'ablation de la microglie dans les larves de poisson zèbre a été effectuée par microinjection d'un morpholino oligonucléotide (MO) anti-sens. Les MO sont des oligomères synthétisés chimiquement qui se lient à l'ARNm d'un gène d'intérêt et qui empêchent leur traduction ou leur épissage (Draper, Morcos, and Kimmel 2001; Stainier et al. 2017; Summerton 1999). Il est à noter que l'utilisation des MO possède des limites qui sont abordées dans la discussion.

Le morpholino (MO) utilisé dans ce travail est dirigé contre l'ARNm de PU.1 (dénommé « MO PU.1 » dans la suite). Ce gène est impliqué dans le développement des macrophages primitifs. L'injection du MO PU.1 bloque la traduction de l'ARNm de PU.1, ce qui permet d'obtenir des larves dépourvues de microglie. La séquence du MO utilisé est la suivante : 5'-GAT ATA CTG ATA CTC CAT TGG TGG T-3'.

La veille du jour de l'injection, des bacs d'accouplement sont préparés. Pour cela, un couple est placé dans chaque bac d'accouplement. Les 2 poissons de chaque bac sont isolés par une séparation transparente. On place également une image de billes colorées en dessous du bac, lui aussi transparent, afin de stimuler les poissons.

Le matin de l'injection, on prépare une solution de MO PU.1 à 0,88 mM, KCl 0,1 mM et RhodamineB dextran 0.03 mM (témoin de microinjection) dans de l'eau ultra-pure (résistivité : 18 M Ω). Cette solution est insérée dans un micro-capillaire étiré dont l'extrémité

est coupée de sorte que son diamètre soit d'environ 0,02 mm. Le capillaire est ensuite inséré dans un microinjecteur électronique FemtoJet[®] 4i (Eppendorf) et la pression est réglée à l'aide de l'InjectMan[®] 4 (Eppendorf) de sorte que la goutte éjectée du capillaire soit d'un diamètre d'environ 0,15 mm, ce qui correspond à un volume injecté d'environ 1,8 nl. Parallèlement, les séparations des bacs d'accouplement sont retirées, permettant l'interaction entre le mâle et la femelle, et les bacs sont régulièrement vérifiés afin de surveiller la présence d'œufs. Le cas échéant, les œufs sont récupérés dans les instants suivant la ponte, placés contre une lame et microinjectés dans le sac vitellin, proche de la jonction avec l'unique cellule à ce stade. Une fois microinjectés, les œufs sont transférés dans une boîte de Petri contenant de la FW, supplémentée par du bleu de méthylène (0,02‰), puis placées dans un incubateur à 28,5°C.

À la fin de la matinée, un premier nettoyage est effectué en retirant les éventuels œufs n'ayant pas résisté à la microinjection. Un deuxième nettoyage est effectué en fin de journée pour retirer les embryons morts et les œufs non fécondés. Le lendemain matin, la rhodamine des embryons injectés est vérifiée à la loupe fluorescente : si le signal de la rhodamine est bien diffusé dans l'embryon entier, l'embryon est considéré comme bien injecté et est gardé pour la suite des expériences. Sinon, l'embryon est sacrifié.

III. TRAITEMENT AU DFP

Le diisopropylfluorophosphate ou DFP (Sigma) est dilué avec du DMSO à une concentration stock de 1 mg/ml, ce qui équivaut à 5,43 mM. À partir de ce stock, des aliquots de 1,5 mM sont préparés par dilution au DMSO. Pour le traitement, une dilution au 1/100^e est effectuée avec de la FW pour obtenir une concentration finale d'exposition de 15 µM de DFP dans 1% de DMSO. Les larves ont été exposées au traitement contrôle (1% DMSO) ou au DFP (15 µM, 1% DMSO) à 5 jpf pendant 6 heures, sauf indication contraire. Pour toute la suite, on simplifiera tous les traitements au « DFP dans 1% de DMSO » par « DFP » pour plus de clarté.

IV. IMAGERIE *IN VIVO*

L'imagerie *in vivo* des larves de 5 jpf a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal inversé Leica SP8 équipé d'un objectif 20×/0,75 à multi-immersion. Les larves sont paralysées à l'aide de 350 µM de bromure de pancuronium (PB) et sont immobilisées au centre d'une boîte de 35 mm de diamètre à fond en verre, à l'aide d'agarose à bas point de fusion 1,2%

supplémenté de DMSO 1% ou de DFP 15 μM . Le microscope étant inversé, les larves sont montées dans l'agarose sur le dos et au fond de la boîte. Quelques gouttes d'une solution de DMSO 1% ou de DFP 15 μM sont ajoutées par-dessus l'agarose une fois qu'elle s'est gélifiée, afin qu'elle ne sèche pas. Le contact entre l'objectif du microscope et l'échantillon à imager est assuré par de l'huile d'indice de réfraction 1,33.

4.1. Visualisation de la microglie

L'observation de la microglie s'est basée sur deux aspects : sa morphologie et sa dynamique. Des paramètres adaptés à chacun de ces deux aspects ont été utilisés. Dans les deux cas, l'utilisation de la lignée Tg(mpeg1:mCherryF) permet de visualiser les macrophages et la microglie, mais l'imagerie et l'analyse du tectum optique uniquement permet d'exclure la grande majorité des macrophages. Les cellules étudiées sont donc bien des cellules microgliales, à quelques exceptions près possibles.

Pour observer la morphologie de la microglie à un temps précis post-traitement, une photo a été prise au temps voulu en excitant le fluorochrome mCherryF avec un laser DPSS 561. Le laser excite l'échantillon à la longueur d'onde 561 nm et le signal émis récupéré est dans la gamme [586 ; 790] nm. Une tranche de 100 μm est photographiée à la résolution 1024×1024 .

Pour étudier la dynamique de la microglie, les mêmes paramètres d'excitation et d'émission sont utilisés. Une tranche de 43,5 μm est acquise en *time-lapse* pendant les 30-45 dernières minutes du traitement (entre la 5^{ème} et la 6^{ème} heure de traitement).

La morphologie et la dynamique de la microglie ont été analysées par le logiciel d'analyse d'images 3D Imaris (Bitplane). Pour la morphologie des cellules microgliales, les paramètres suivants ont été quantifiés :

- La sphéricité (S_p) : il s'agit un coefficient mesurant à quel point un objet est sphérique. C'est un coefficient sans unité, compris entre 0 et 1, 1 représentant un objet complètement sphérique. Ce paramètre, Ψ , a été défini par Hakon Wadell en 1932 (Wang and Fan 2013) comme étant le ratio entre l'aire surfacique d'une particule (A_p) et l'aire surfacique d'une sphère de même volume (V_p) que la particule d'intérêt :

$$\Psi = \frac{\pi^{1/3} \times (6V_p)^{2/3}}{A_p}$$

- L'aire surfacique (S)

- Le volume
- Le nombre de prolongements (NP)
- La longueur totale des prolongements (TL)
- La longueur moyenne d'un prolongement (ML)

Ces mêmes paramètres ont été utilisés pour l'étude de la population microgliale par cluster, à l'exception du volume, qui n'a pas montré de différence entre la condition contrôle et la condition traitement (voir Chapitre 4, « Les cellules microgliales changent de morphologie après exposition au DFP »). Pour une microglie ramifiée, nous avons établi les seuils suivants : une sphéricité inférieure ou égale à 0,6 ; une aire surfacique supérieure ou égale à 2400 μm^2 ; un nombre de prolongements supérieur ou égal à 6 ; une longueur totale de ces prolongements supérieur ou égale à 90 μm ; et une longueur individuelle d'un prolongement supérieure ou égale à 19 μm . Si au moins 3 de ces paramètres étaient vérifiés, la microglie était considérée ramifiée. De la même façon, nous avons établi les seuils suivants pour définir une microglie amiboïde : une sphéricité supérieure ou égale à 0,8 ; une aire surfacique inférieure ou égale à 1500 μm^2 ; un nombre de prolongements inférieur ou égal à 2 ; une longueur totale de ces prolongements inférieure ou égale à 20 μm ; et une longueur individuelle d'un prolongement inférieure ou égale à 7 μm . Si au moins 3 de ces paramètres étaient vérifiés, la microglie était considérée amiboïde. Les cellules microgliales remplissant moins de 3 de ces différents paramètres sont considérées comme étant des cellules microgliales dites « transitionnelles ».

Pour l'étude de la dynamique microgliale, nous avons quantifié la distance parcourue par le corps cellulaire des cellules microgliales.

4.2. Activité calcique neuronale

Pour étudier l'activité calcique neuronale, un *time-lapse* d'un unique plan focal a été acquis. L'excitation du fluorochrome GFP a été réalisée par un laser argon, excitant l'échantillon à 488 nm. Le signal émis récupéré est dans la gamme [493 ; 550] nm. L'unique plan est imagé pendant 45 minutes à 1 heure (entre les 5^{ème} et 6^{ème} heures de traitement) à la résolution 512 × 512 afin d'avoir une vitesse d'acquisition d'environ 2 images par seconde.

L'intensité de fluorescence du tectum optique a été mesurée au cours du temps à l'aide d'une macro sur ImageJ, écrite par Alexandre Brenet, un ancien doctorant de l'équipe. Les variations de fluorescence ($\Delta F/F_0$) ont été calculées sur Microsoft Excel en soustrayant la valeur

moyenne de l'intensité de fluorescence de toutes les images d'un même film (F_0) à F , la valeur de l'intensité d'une image donnée, et en divisant le tout par F_0 :

$$\text{Variation de fluorescence} = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0}$$

De plus, une correction est ajoutée afin de remédier à la dérive de fluorescence au cours du temps qui peut avoir lieu lors de longues acquisitions : la moyenne des valeurs les plus basses (valeurs situées en dessous de la médiane) dans une fenêtre glissante de 20 secondes autour d'une image a été soustraite. Les variations de fluorescence supérieures à 0,035 ont été considérées comme des événements calciques après vérification visuelle.

V. ÉTUDE DE L'INFLAMMATION ET DE L'ACTIVITÉ NEURONALE PAR RT-QPCR

Le profil inflammatoire des larves a été étudié par RT-qPCR en quantifiant l'expression de différentes cytokines (*il-1 β* , *il-8*, *il-4* et *tgf- β 3*). Une cinétique de ce profil a été réalisée entre 0 h et 6 h d'exposition pour l'inflammation globale. Pour la neuroinflammation et l'inflammation en l'absence de microglie après microinjection du MO PU.1, le profil inflammatoire a été étudié après 6 h d'exposition au DMSO ou au DFP.

L'activité neuronale a également pu être étudiée par RT-qPCR en quantifiant l'expression de *fosab*, orthologue dans le poisson zèbre de *c-Fos* (chez les mammifères). Cette étude a été réalisée après 6 h d'exposition au DMSO ou au DFP.

5.1. Obtention des échantillons

5.1.1. Inflammation globale et activité neuronale

Pour l'étude de l'inflammation globale, les échantillons ont été obtenus de la façon suivante. Les larves de 5 jpf ont été exposées au DMSO 1% ou au DFP 15 μ M pendant le temps souhaité (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h ou 6 h). Les larves ont ensuite été distribuées dans des tubes de 1,5 ml à raison de 7 larves par tube. Le liquide dans lequel les larves baignent a été entièrement retiré et les tubes ont été rapidement placés sur carboglace pour congélation. Les échantillons congelés ont finalement été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

La même procédure est appliquée pour l'étude de l'activité neuronale par quantification de *fosab* à la seule différence qu'un seul temps d'exposition a été étudié (6 heures).

5.1.2. Neuroinflammation

Pour étudier la neuroinflammation, les larves de 5 jpf ont été exposées au DMSO 1% ou au DFP 15 μ M pendant 6 h. Le cerveau des larves a ensuite été disséqué. Une fois un cerveau disséqué, il est placé dans un tube de 1,5 ml contenant 100 μ l d'un tampon de lyse (tampon LB1 du kit d'extraction RNA XS Plus de Qiagen). Ce tampon de lyse permet notamment d'inactiver les RNases, ce qui permet d'éviter la dégradation des ARN. Une fois que le tube contient 10 cerveaux disséqués, le tube est placé sur carboglace pour congélation. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

5.2. Extraction d'ARN et dosage

Les échantillons sont extraits à l'aide du kit d'extraction RNA XS Plus (Qiagen) et selon le protocole décrit par le fournisseur, après avoir broyé les larves à l'aide d'une seringue de 1 ml, équipée d'une aiguille 26G 7/8".

Après extraction, les échantillons d'ARN sont conservés dans la glace le temps du dosage. Le dosage d'ARN a été mesuré par le spectrophotomètre NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Un aliquot de 1 μ l est fait pour chaque échantillon afin de vérifier la qualité de l'ARN extrait. Les échantillons d'ARN sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

5.3. Vérification de la qualité de l'ARN

Après chaque extraction, la qualité des ARN est vérifiée par électrophorèse afin de s'assurer qu'ils ne soient pas dégradés. Pour cela, on dénature l'ARN à la chaleur et en présence de formamide, qui va permettre de garder l'ARN sous sa forme dénaturée. L'échantillon est ensuite refroidi brusquement en le mettant dans la glace. En parallèle, on prépare un gel d'agarose 1% avec du tampon TBE (Tris/Borate/EDTA) dans lequel on rajoute 0,5% (5 μ l pour 100 ml d'agarose 1%) de bromure d'éthidium (BET). Une fois le gel coulé et les échantillons et le marqueur de poids moléculaire déposés, on laisse migrer à 100 V pendant 30-45 minutes et on révèle le gel par UV.

L'intégrité des échantillons d'ARN est validée lorsque les 2 bandes d'ARN ribosomique 28S et 18S sont bien visibles.

5.4. Transcription inverse (RT)

Une fois l'intégrité des échantillons d'ARN vérifiée, on effectue une transcription inverse (RT, pour *reverse transcription*) afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN. Pour cela, à l'aide des données issues du dosage d'ARN, on effectue la RT de 1 µg d'ARN en utilisant le kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad).

L'ADNc obtenu est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

5.5. PCR quantitative (qPCR)

Après obtention de l'ADNc, on réalise la PCR quantitative (qPCR) avec l'iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Les échantillons sont passés en triplicats. Les amorces ont été conçues pour couvrir une jonction exon-exon afin d'éviter l'amplification d'un éventuel contaminant d'ADN génomique. Ils ont été produits par Eurofins Genomics.

Gène	Forward/Reverse	Séquence
<i>il-1β</i>	Forward	5'-CTT AAC CAG CTC TGA AAT GAT G-3'
	Reverse	5'-TGT CGC ATC TGT AGC TCA TTG-3'
<i>il-8</i>	Forward	5'-TGA CCA TCA TTG AAG GAA TGA G-3'
	Reverse	5'-CAT CAA GGT GGC AAT GAT CTC-3'
<i>il-4</i>	Forward	5'-GAG ACA GGA CAC TAC TCT AAG-3'
	Reverse	5'-GTT TCC AGT CCC GGT ATA TG-3'
<i>tgf-β3</i>	Forward	5'-AAA ACG CCA GCA ACC TGT TC-3'
	Reverse	5'-CCT CAA CGT CCA TCC CTC TG-3'
<i>fosab</i>	Forward	5'-AAC CAG ACT CAG GAG TTC AC-3'
	Reverse	5'-GGA GAA AGC TGT TCA GAT CTG-3'
<i>tbp</i>	Forward	5'-GTG CAC AGG AGC CAA AAG TG-3'
	Reverse	5'-GTT CAT AGC TGC TAA ACT GCT G-3'

Tableau 3 : séquences des amorces utilisées pour la qPCR

La qPCR est réalisée avec un thermocycleur CFX384 (Bio-Rad) et les données sont analysées avec le logiciel CFX Maestro de Bio-Rad. Les niveaux d'expression sont rapportés à celui du gène de référence *thp* puis sont normalisés par rapport aux valeurs de la condition contrôle.

VI. STATISTIQUES

Toutes les données ont été analysées et mises sous forme de graphiques avec GraphPad Prism 5 ou 9. La normalité des données a été vérifiée avec le test de normalité de d'Agostino-Pearson. Les données ne suivant pas une distribution selon la loi normale ont été comparées entre elles à l'aide d'un test de Mann-Whitney. Dans le cas contraire, un *t*-test bilatéral de Student a été effectué avec la correction de Welch si les variances des groupes étaient différentes, ou sans la correction de Welch dans le cas contraire. Le seuil de significativité choisi est $p \leq 0,05$.

Dans le cas où 2 facteurs étaient étudiés (traitement au DFP et présence ou non de microglie), une ANOVA à 2 voies a été effectuée suivi d'un post-test de Tukey.

Chapitre 3 :

Établissement du modèle

PARTIE I : DÉFAUTS COMPORTEMENTAUX, HYPEREXCITATION NEURONALE ET MORT CELLULAIRE CÉRÉBRALE

“Organophosphorus diisopropylfluorophosphate intoxication in zebrafish larvae causes behavioral defects, neuronal hyperexcitation and neuronal death”

Alexandre Brenet*, **Julie Somkhit***, Rahma Hassan-Abdi, Constantin Yanicostas, Christiane Romain, Olivier Bar, Alexandre Igert, Dominique Saurat, Nicolas Taudon, Gregory Dal-Bo, Florian Nachon, Nina Dupuis & Nadia Soussi-Yanicostas

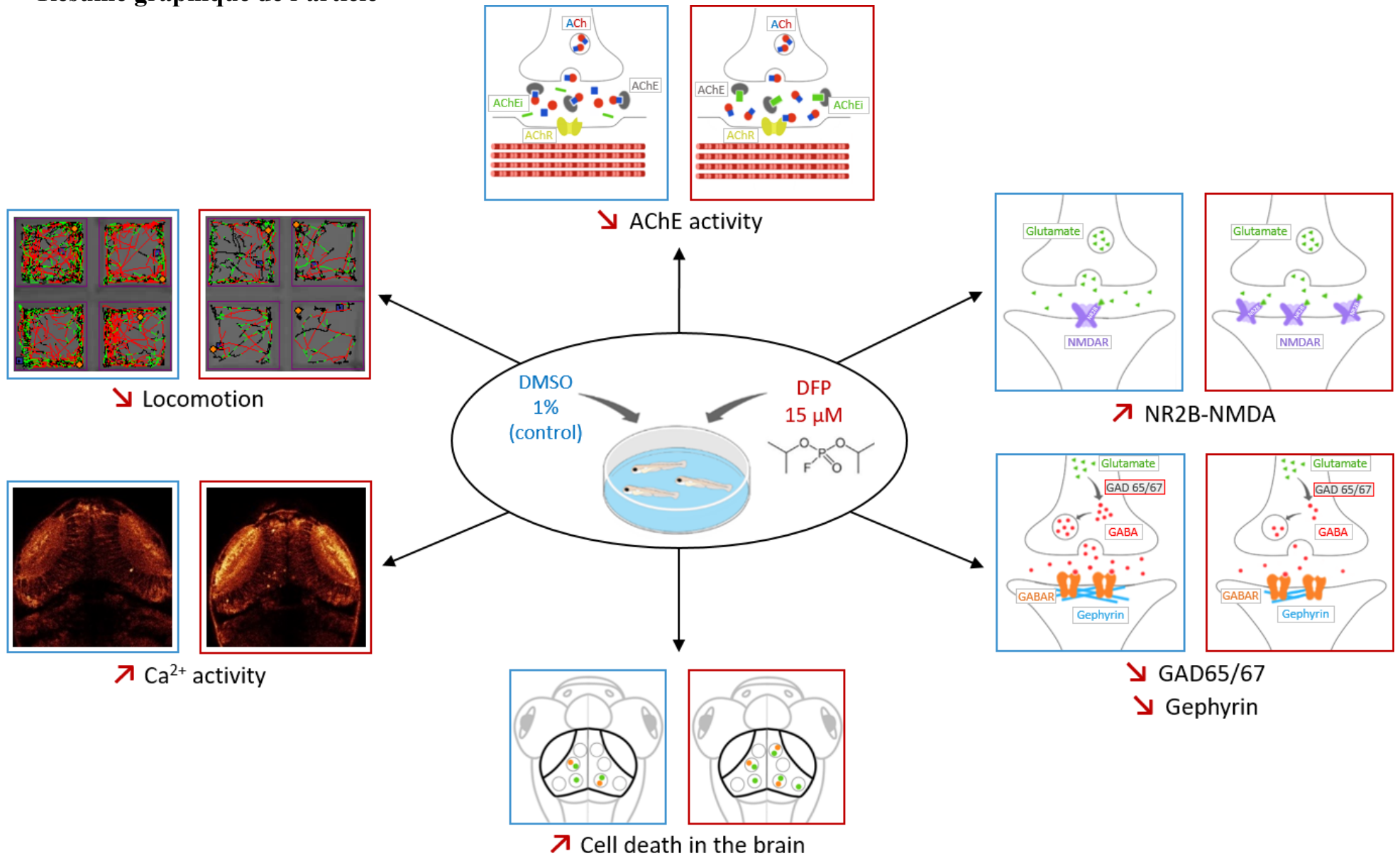
* : **co-premiers auteurs**

Publié le 4 Octobre 2019 dans le journal **Scientific Reports**, doi : 10.3390/cells8101199

Résumé de l'article

Largement utilisés en tant que pesticides ou agents de guerre, les organophosphorés (OP) représentent un réel danger de santé publique. Ces composés chimiques agissent en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme chargée de dégrader l'acétylcholine (ACh) et ainsi de mettre fin à une transmission synaptique. Les traitements actuels contre l'intoxication aiguë aux OP sont efficaces s'ils sont administrés rapidement, mais l'inhibition de l'AChE par les OP peut vite devenir réfractaire à ces derniers, d'où le besoin de nouvelles approches thérapeutiques. Pour pallier ce besoin, il est nécessaire de développer un modèle animal d'intoxication aux OP qui permettrait le criblage de molécules. Cet article décrit la mise au point d'un modèle d'intoxication aiguë au diisopropylfluorophosphate (DFP), un OP modérément toxique et analogue au sarin, en utilisant le poisson zèbre. Nous avons montré que suite à une exposition aiguë au DFP, les larves de poisson zèbre reproduisent les caractéristiques principales d'un empoisonnement aux OP : on observe dans un premier temps une inhibition rapide de l'AChE, suivie au niveau périphérique par une paralysie, et au niveau central par une hyperexcitabilité neuronale, signe caractéristique des crises épileptiformes. Ces crises sont d'ailleurs calmées grâce à l'action du diazépam, connu pour ses propriétés anti-convulsivantes et anti-épileptiques. Par ailleurs, nous avons également observé une augmentation de la mort cellulaire dans le cerveau des larves exposées au DFP ainsi qu'une augmentation de l'expression de marqueurs de synapses excitatrices (E) et une diminution de l'expression de marqueurs de synapses inhibitrices (I). Ces modifications moléculaires, déjà observées dans des modèles rongeurs d'intoxication aux OP, indiquent un déséquilibre de la balance synaptique E/I en faveur de l'excitation, qui pourrait être à l'origine de l'hyperexcitabilité neuronale. Ces résultats montrent la pertinence de notre modèle pour l'étude de la pathophysiologie des intoxications aux OP et la recherche de nouveaux antidotes.

Résumé graphique de l'article





OPEN

Organophosphorus diisopropylfluorophosphate (DFP) intoxication in zebrafish larvae causes behavioral defects, neuronal hyperexcitation and neuronal death

Alexandre Brenet^{1,4}, Julie Somkhit^{1,4}, Rahma Hassan-Abdi¹, Constantin Yanicostas¹, Christiane Romain¹, Olivier Bar¹, Alexandre Igert², Dominique Saurat³, Nicolas Taudon³, Gregory Dal-Bo², Florian Nachon², Nina Dupuis^{2,5} & Nadia Soussi-Yanicostas^{1,5}✉

With millions of intoxications each year and over 200,000 deaths, organophosphorus (OP) compounds are an important public health issue worldwide. OP poisoning induces cholinergic syndrome, with respiratory distress, hypertension, and neuron damage that may lead to epileptic seizures and permanent cognitive deficits. Existing countermeasures are lifesaving but do not prevent long-lasting neuronal comorbidities, emphasizing the urgent need for animal models to better understand OP neurotoxicity and identify novel antidotes. Here, using diisopropylfluorophosphate (DFP), a prototypic and moderately toxic OP, combined with zebrafish larvae, we first showed that DFP poisoning caused major acetylcholinesterase inhibition, resulting in paralysis and CNS neuron hyperactivation, as indicated by increased neuronal calcium transients and overexpression of the immediate early genes *fosab*, *junBa*, *npas4b*, and *atf3*. In addition to these epileptiform seizure-like events, DFP-exposed larvae showed increased neuronal apoptosis, which were both partially alleviated by diazepam treatment, suggesting a causal link between neuronal hyperexcitation and cell death. Last, DFP poisoning induced an altered balance of glutamatergic/GABAergic synaptic activity with increased NR2B-NMDA receptor accumulation combined with decreased GAD65/67 and gephyrin protein accumulation. The zebrafish DFP model presented here thus provides important novel insights into the pathophysiology of OP intoxication, making it a promising model to identify novel antidotes.

Organophosphorus (OP) compounds comprise highly poisonous substances widely used as chemical pesticides but also as warfare agents. As a result of their massive use for agricultural purposes worldwide, OP poisoning represents a major public health issue with 3 million severe intoxications reported annually and more than 200,000 deaths, primarily suicides^{1–4}. OPs are potent inhibitors of cholinesterases, including acetylcholinesterase (AChE), whose blockade causes a massive accumulation of acetylcholine and overstimulation of cholinergic receptors (ChRs) at both neuromuscular junctions and CNS cholinergic synapses⁵. In the brain, ChR hyperactivation causes epileptic seizures, which if not rapidly treated, may develop into life-threatening *status epilepticus* (SE)⁶. Besides their immediate toxicity, OPs also cause long-term neurological comorbidities, such as psychomotor deficits and recurrent seizures^{7,8}. Existing countermeasures combine ChR agonist atropine with an AChE reactivator such as 2-PAM, often associated with γ -aminobutyric acid receptor (GABAR) agonist diazepam (DZP). These treatments are lifesaving, but do not reverse brain damage or prevent subsequent occurrence of seizures

¹NeuroDiderot, Inserm, Université de Paris, 75019 Paris, France. ²Département de toxicologie et risques chimiques, Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), 91 220 Brétigny-sur-Orge, France. ³Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Unité de Développements Analytiques et Bioanalyse, 91 220 Brétigny-sur-Orge, France. ⁴These authors contributed equally: Alexandre Brenet and Julie Somkhit. ⁵These authors jointly supervised this work: Nina Dupuis and Nadia Soussi-Yanicostas. ✉email: nadia.soussi@inserm.fr

or psychomotor deficits, emphasizing the need for new, more potent antidotes. To meet this need, an animal model of OP poisoning that would faithfully reproduce the consequences of OP intoxication in humans and be amenable to drug screening would help achieve a better understanding of the pathophysiology of OP poisoning and identify therapeutic entities counteracting the harmful effects of these compounds. Although it has long been known that acute OP intoxication causes neuropathological changes in the brain^{8–11}, the precise nature of these changes and their extent remain under-researched.

Here, we describe a zebrafish model of OP poisoning and characterize the neuron defects induced by acute intoxication. Over the past decade, besides its rapidly expanding use as a human disease model^{12–16}, the zebrafish has become one of the leading animal models for toxicology research and drug discovery¹⁷. The zebrafish is a versatile, powerful and easy-to-breed vertebrate model that offers significant advantages for in vivo drug screening and neurotoxicology investigations. These advantages include a CNS that displays an overall organization similar to that of mammals with full conservation of the different neuronal and glial cell types and all neurotransmitters^{18–22}. To model OP poisoning in zebrafish, we chose DFP, an OP analogue of the warfare agent sarin, but less volatile and much less dangerous, that has been widely used as a prototypic OP in toxicology research. In particular, previous studies in rodents have shown that acute DFP poisoning causes potent AChE inhibition, inducing epileptic seizures, neuronal death, memory impairment and neuroinflammation^{9,23}.

To better understand the physiopathology of OP poisoning and subsequent neuronal deficits, we combined behavioral analysis and in vivo recording of neuronal calcium transients with molecular and immunocytochemical approaches. Our data showed that zebrafish larvae exposed to DFP displayed major inhibition of AChE activity correlated with reduced motor activity. DFP poisoning also induced CNS hyperexcitation as shown by both the large increase in the number of calcium transients in brain neurons and the overexpression of the immediate early genes (IEGs) *fosab*, *junBa*, *npas4b*, and *atf3*, transcription factor encoding genes which are transcribed to high levels in the very first hours that follow neuron excitation and epileptic seizures^{24,25}. In addition to epileptiform seizures, DFP exposure also caused an increased neuronal apoptosis, both partially mitigated by diazepam administration, suggesting that the increased neuronal apoptosis was a direct consequence of neuronal hyperexcitation. Last, DFP poisoning caused increased NR2B-NMDA subunit receptor accumulation combined with decreased accumulation of both GAD65/67 and gephyrin proteins, suggesting that DFP exposure promotes epileptiform neuronal hyperexcitation as a result of a shift in the glutamatergic/GABAergic balance activity toward glutamate-mediated excitation.

The zebrafish model of DFP poisoning faithfully reproduces the neuronal deficits observed in both humans and rodents exposed to DFP, and also provides interesting new insights into the neurotoxicity of OP agents, making it a promising tool to identify novel, more potent antidotes.

Results

Larvae exposed to DFP showed increased mortality, reduced motility and AChE inhibition. In order to study DFP toxicity, 5 days post-fertilization (dpf) larvae were exposed to DFP and several classic features of OP poisoning were assessed (Fig. 1a). First, we determined DFP toxicity in zebrafish, by exposing 5 dpf larvae to increasing concentrations of DFP (15, 20, 30 and 50 μ M) and recording larval survival over a 6 h period. Results showed that all larvae exposed to either 30 μ M or 50 μ M died during the 6 h incubation period and displayed major morphological defects, such as curved tails and shorter body length, whereas 50% of those exposed to 20 μ M died and showed mild morphological defects (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1). As we aimed at investigating brain damage associated with mid-acute DFP toxicity, we selected the concentration of 15 μ M, which causes a larval lethality of 20% (LC20) and no visible phenotypic defects in surviving larvae. We also checked that DFP was not hydrolyzed during the 6 h incubation time and results showed that DFP diluted in fish water (FW) was almost stable with an average loss of 2% per hour, approximately (Fig. 1c). Then, we analyzed the phenotype of larvae exposed to 15 μ M DFP for 6 h and we observed no phenotypic defects in surviving larvae (Fig. 1d–h), except a slight reduction of body length (Fig. 1i). Histopathological analysis also indicated that following a 6 h exposure to 15 μ M DFP, surviving larvae did not show any visible histological abnormalities in the brain (Supplementary Fig. 2).

As AChE inhibition is the key hallmark of OP poisoning, we next measured AChE activity in larvae exposed to 15 μ M DFP, and we observed a 50% decrease in AChE activity as early as 2 h after DFP addition, worsening to 25% residual activity from 4 h exposure onwards (Fig. 1j). We next investigated whether the decreased AChE activity was correlated with the paralysis of the larvae. Results showed that DFP-treated larvae displayed a markedly decreased locomotor activity compared to control larvae as early as 2 h after DFP addition, as indicated by the distance traveled by larvae, which was recorded using a Zebrabox (ViewPoint) automated device (Fig. 1k). Thus, after DFP exposure, zebrafish larvae displayed reduced motor activity as the likely result of a massive AChE inhibition.

DFP exposure induced neuronal hyperexcitation. Increased transcription of the IEG *c-Fos* in brain neurons has been repeatedly observed following epileptic seizures²⁶. As a first investigation of the consequences of DFP poisoning on neuronal activity, we therefore studied, by immunocytochemistry, the accumulation of the Fosab protein, the zebrafish orthologue of c-Fos, in the brain of DFP-treated and control larvae (Fig. 2a,b). Results clearly indicated that DFP-treated larvae displayed a highly significant increase in the number of neurons expressing Fosab ($p < 0.0001$) in both the optic tectum (Fig. 2c–e), and telencephalon (Supplementary Fig. 3). To further investigate whether DFP exposure induces overexpression of other IEGs, we analyzed, by qRT-PCR, the expression in the brain of *fosab*, *atf3*, *junBa*, *npas4a*, and *npas4b*, the zebrafish orthologues of *C-FOS*, *JUNB*, *ATF3*, and *NPAS4*, respectively, four genes that are expressed at high levels in the very first hours that follow epileptic seizures in pharmacological models of epilepsy in rats²⁵. Interestingly, qRT-PCR showed a significant

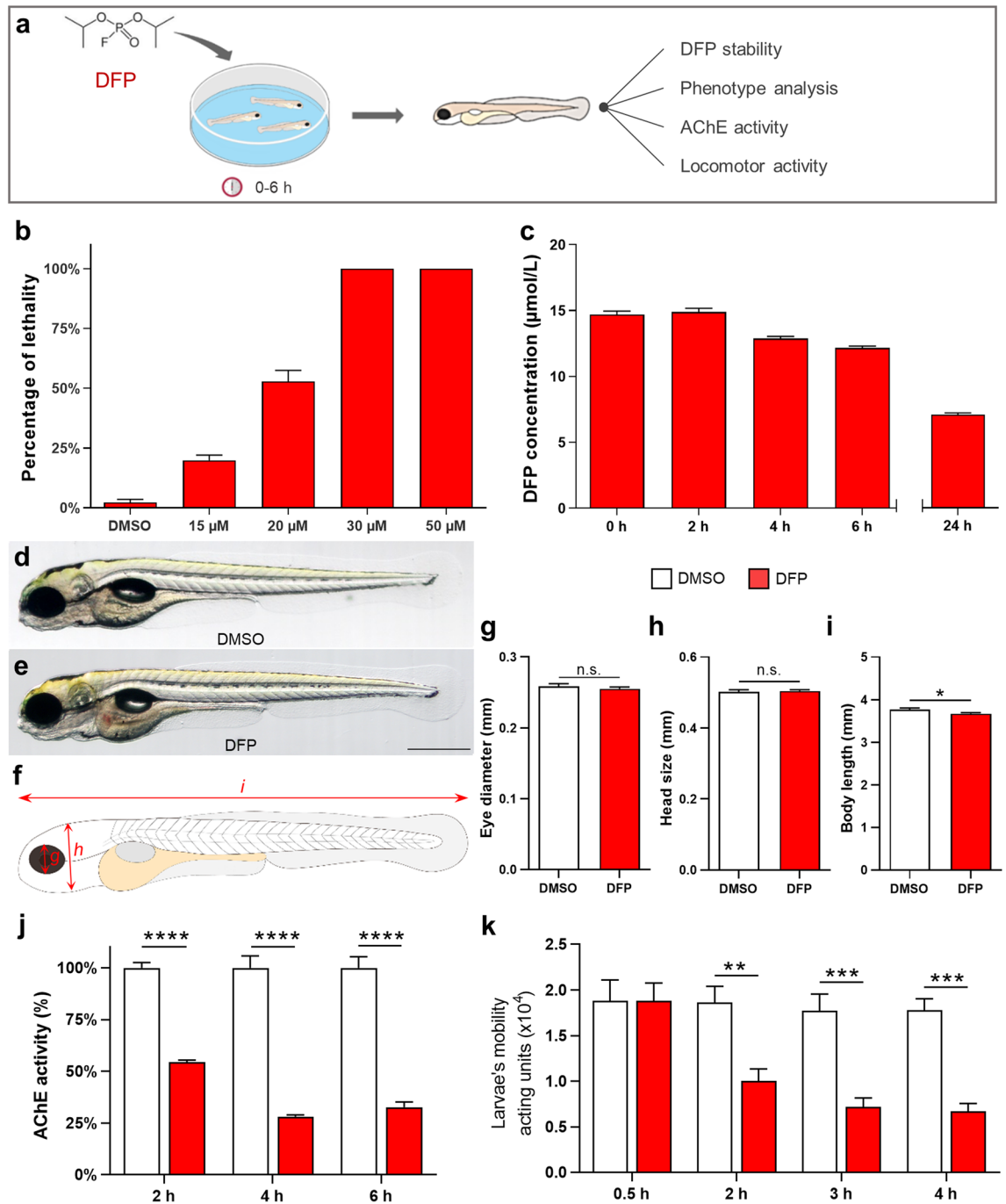


Figure 1. DFP-exposed zebrafish larvae displayed reduced motility and AChE inhibition. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to 15, 20, 30 or 50 μM DFP or vehicle (1% DMSO) and larval lethality, phenotypic defects, motor activity, and AChE activity were studied during the next 6 h. (b) Lethality rates of 5 dpf larvae exposed for 6 h to 15, 20, 30 or 50 μM DFP and selection of 15 μM DFP as optimal concentration (LC20). (c) Residual concentrations of DFP measured at different time points from a 15 μM solution diluted in fish water (E3 medium). (d,e) Morphology of 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle (d) or 15 μM DFP (e). (f) Scheme depicting measurements of zebrafish larva morphology. (g–i) Quantification of eye diameter (g), head size (h) and body length (i) in larvae exposed for 6 h to either vehicle ($n=26$) or 15 μM DFP ($n=26$) (Student’s unpaired t -test: n.s., non-significant; *, $p < 0.05$). (j) Quantification of AChE activity in larvae exposed to 15 μM DFP ($n=5$) or vehicle ($n=5$), for 2, 4, and 6 h (two-way ANOVA with Sidak’s multiple comparisons test: ****, $p < 0.0001$). (k) Motor activity of 5 dpf larvae exposed to either 15 μM DFP ($n=44$) or vehicle ($n=12$) (two-way ANOVA with Sidak’s multiple comparisons test: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

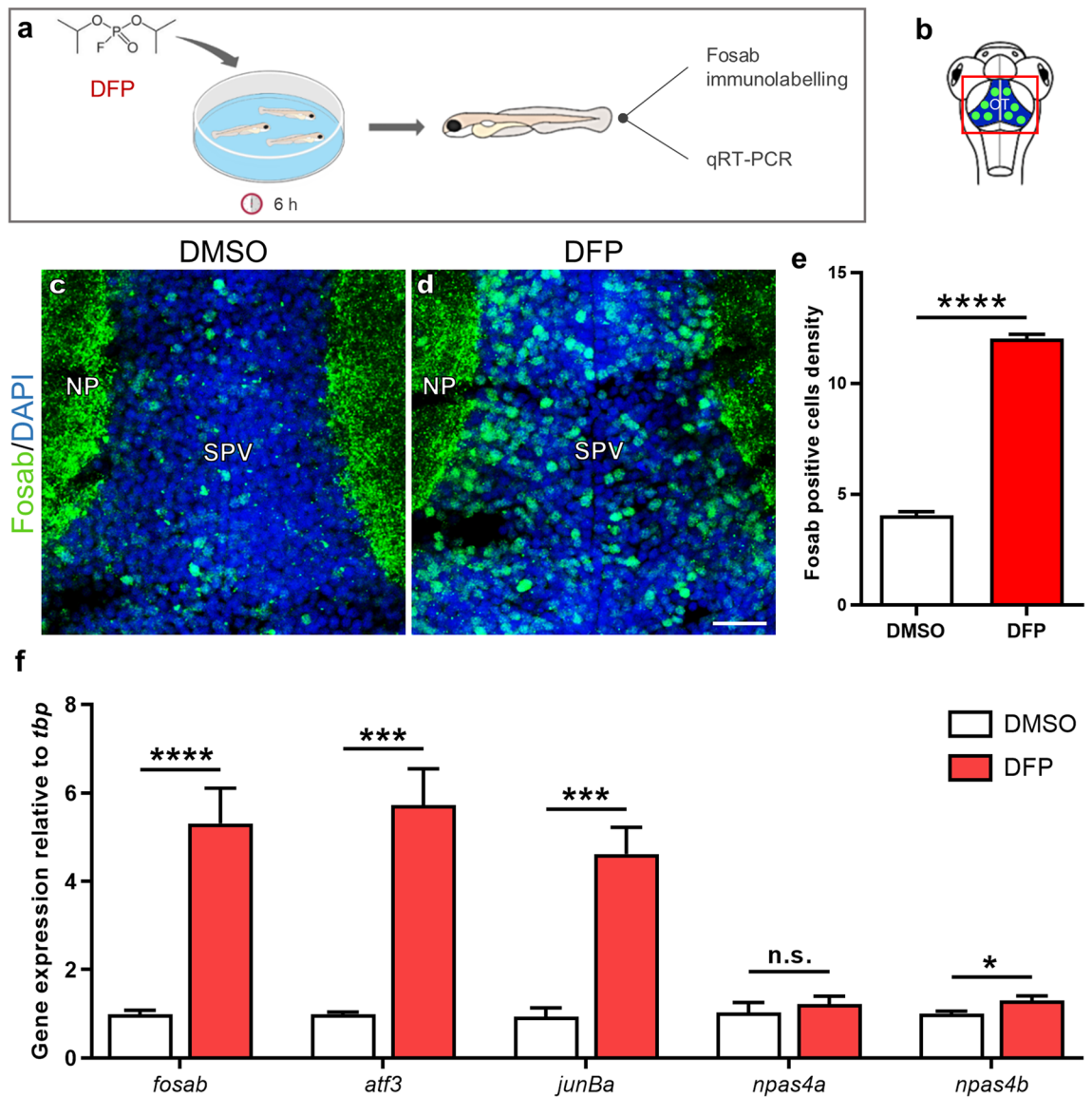


Figure 2. DFP exposure induces overexpression of the IEGs *fosab*, *atf3*, *junBa*, and *npas4b*. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed for 6 h to either 15 μ M DFP or vehicle (1% DMSO) before processing for either Fosab immunostaining or brain dissection followed by RNA extraction and qRT-PCR analysis. (b) Scheme of a 5 dpf larva head with the red box showing the region of interest in the brain, uncovering the optic tectum (OT). (c,d) Fosab immunolabeling of optic tectum neurons in 5 dpf larvae exposed to either vehicle (c) or 15 μ M DFP (d). Scale bar: 20 μ m. (e) Quantification of Fosab-expressing neuron density in the optic tectum of 5 dpf larvae exposed to either vehicle ($N=3$; $n=8$) or 15 μ M DFP ($N=3$; $n=11$) (unpaired t -test: ****, $p < 0.0001$). (f) qRT-PCR analysis of the accumulation of *fosab*, *atf3*, *junBa*, *npas4a* and *npas4b* RNAs relative to that of *tbp* in 5 dpf larvae exposed to either vehicle ($n=6$) or 15 μ M DFP ($n=6$) (Student's unpaired t -test: n.s., non-significant; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). N = number of larvae and n = number of slices. Abbreviations: NP, neuropil; SPV, stratum periventriculare.

increase in the accumulation of *fosab* (control: 0.989 ± 0.088 vs. DFP: 5.305 ± 0.804 ; $p < 0.0001$), *junBa* (control: 0.938 ± 0.197 vs. DFP: 4.619 ± 0.603 ; $p < 0.001$), *atf3* (control: 0.993 ± 0.047 vs. DFP: 5.723 ± 0.603 ; $p < 0.003$), and *npas4b* (control: 1.007 ± 0.054 vs. DFP: 1.294 ± 0.109 ; $p < 0.05$), in larvae exposed to DFP when compared to that observed in controls (Fig. 2f), suggesting that DFP exposure causes neuronal hyperexcitation. Note that expression of the second zebrafish orthologue of NPAS4, *npas4a*, did not change following DFP exposure (control: 1.03 ± 0.228 vs. DFP: 1.226 ± 1.175 ; $p = 0.5$) (Fig. 2f).

We then sought to visualize the increased neuronal activity in larvae exposed to DFP using calcium imaging (Fig. 3a,b), a technique that fully reflects neuronal activity in zebrafish epilepsy models in vivo^{14,27}. Five dpf larvae from the transgenic line Tg[Huc:GCaMP5G] were treated with DFP or vehicle (DMSO) and calcium transients were recorded during the following 6 h using time-lapse confocal microscopy (Supplementary Videos 1 and 2). Interestingly, in DFP-treated larvae, we observed numerous intense calcium transients, from approximately

1 h post-exposure onward, which were highly reminiscent of those seen in zebrafish genetic epilepsy models¹⁴. Moreover, these calcium transients were mostly seen in the neuropil region, where a large number of synaptic connections occur (Fig. 3c–f). Quantification of calcium fluorescence signals confirmed that as early as 1 h after DFP addition, massive calcium transients were detected in DFP-treated larvae (Fig. 3g). We also observed a significant increase in the frequency of the calcium transients from 2 h post-exposure onward (Fig. 3h). Importantly, 3 h after DFP exposure, all larvae displayed numerous massive calcium transients, which were never observed in control larvae, strongly suggesting that zebrafish larvae exposed to acute DFP poisoning display massive neuronal hyperexcitation reminiscent of epileptic seizures. Diazepam (DZP), a GABA receptor agonist of the benzodiazepine family and a component of existing OP cocktail antidotes²⁸, is a well-known inhibitor of neuronal excitation. We therefore checked whether administration of DZP was able to mitigate the increased number and intensity of calcium transients seen in DFP-exposed larvae. Data showed that massive calcium transients seen in larvae exposed for 5 h to 15 μM DFP were markedly reduced in the minutes that followed the addition of 40 μM DZP (Fig. 3i,j), suggesting that the zebrafish DFP model faithfully reproduces the pathophysiology of OP poisoning in humans.

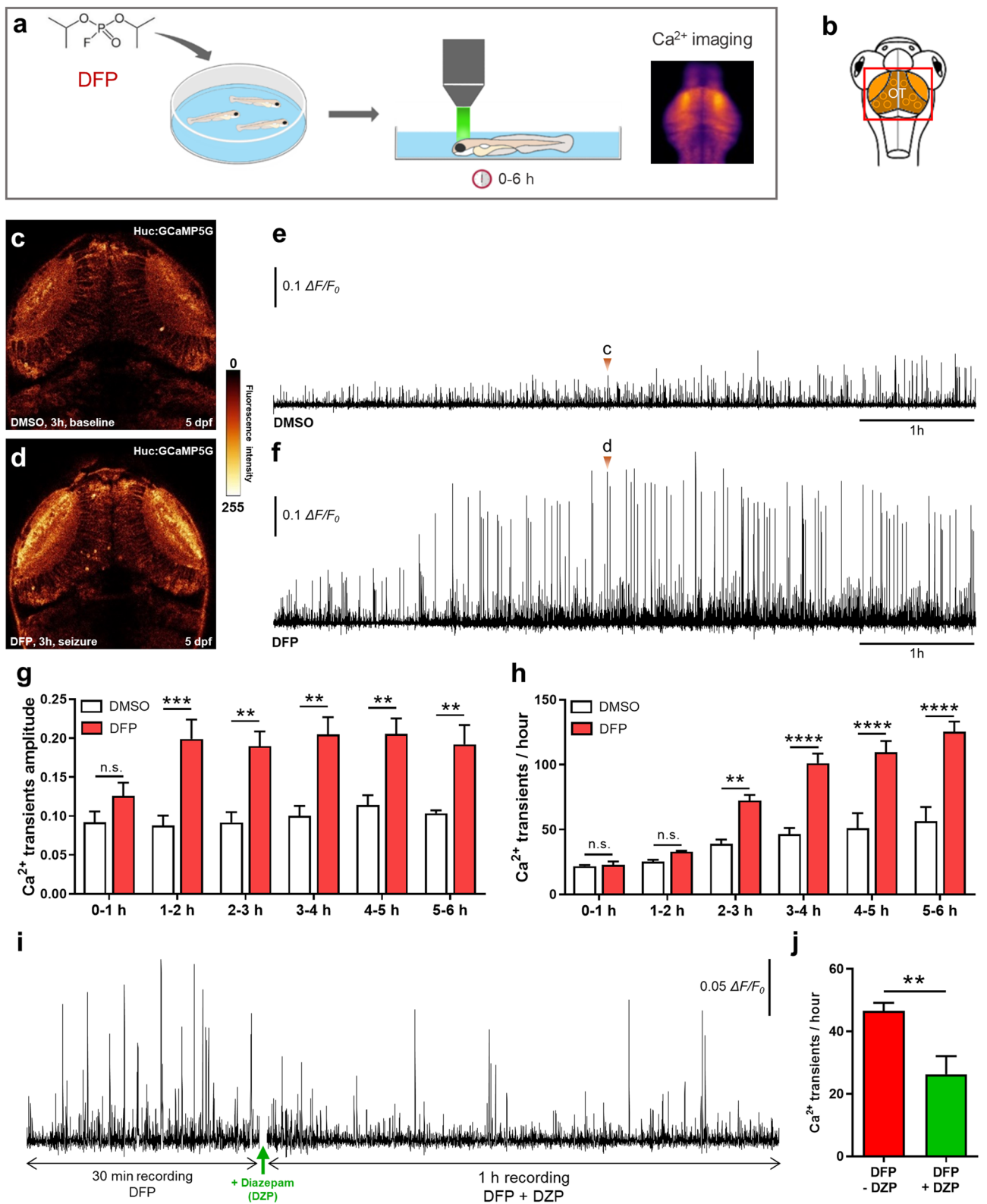
DFP exposure induces increased cell apoptosis. Exposure to warfare OP nerve agents, such as soman, sarin, or VX, causes massive neuronal loss in both humans and animal models^{29–33}. We therefore examined whether DFP exposure also caused increased cell death, using both *in vivo* acridine orange (AO) staining, a vital marker that labels fragmented DNA during late apoptosis stages, and immunodetection of activated-caspase-3 (Act-casp3), a marker of mid-early apoptosis stages (Fig. 4a,b). Interestingly, DFP-exposed larvae displayed a significantly increased number of neurons expressing Act-casp3 compared to that observed in controls (Fig. 4c–e). In addition, *in vivo* AO labeling confirmed that DFP exposure caused an increased cell apoptosis (Fig. 4f–i). We then investigated whether the increased number of apoptotic cells seen in DFP-treated larvae was a direct consequence of neuronal hyperexcitation. To this end, 5 dpf larvae were co-treated for 6 h with 15 μM DFP and 40 μM DZP, and cell apoptosis was visualized by AO labeling. Results indicate that DZP was able to partially alleviate DFP-induced cell apoptosis (Fig. 4h,i), strongly suggesting a link between neuronal hyperexcitation and cell death.

Increased NR2B-NMDA subunit receptor expression and decreased GAD65/67 and gephyrin protein accumulation in DFP exposed larvae. It has been shown that following OP exposure, neuronal seizures are associated with both an increased glutamatergic response and excessive NMDA receptor activation^{34–36}. To examine whether accumulation of the NR2B-NMDA subunit receptor, a component of the main excitatory glutamate receptor, was modified following DFP exposure, brain sections of larvae exposed to DFP or controls were analyzed by immunocytochemistry using an anti-NR2B-NMDA antibody (Fig. 5a,b). Interestingly, results showed a clear increase in the accumulation of NR2B-NMDA protein in the tectal neuropil of DFP-exposed larvae, compared to that seen in controls (Fig. 5c,d). Moreover, the DFP-induced increased NR2B-NMDA accumulation at excitatory synapses was confirmed by quantification of synaptic puncta in the tectal neuropil (Fig. 5e). We also analyzed the synaptic protein gephyrin, which is a scaffolding protein expressed at the inhibitory post-synaptic terminals (Fig. 5a,f). Quantification of this labeling showed a marked decrease in gephyrin synaptic puncta density in the tectal neuropil in DFP-exposed larvae compared to controls (Fig. 5g–i). In contrast no NR2B-NMDA or gephyrin immunolabeling were observed in cell bodies of the stratum periventricular (Supplementary Fig. 4). To further characterize brain reorganization induced by DFP exposure, we analyzed, by immunohistochemistry, the accumulation of glutamate decarboxylase 65/67 (GAD65/67), the enzymes involved in GABA synthesis, the main inhibitory transmitter (Fig. 5a,j). Interestingly, quantification of immunolabeling signals indicated that DFP-treated larvae displayed markedly decreased accumulation of GAD65/67 proteins (Fig. 5k–m). Altogether, these results strongly suggest that DFP exposure induces neuronal hyperexcitation as a result of simultaneous increased glutamatergic activity and decreased GABAergic signaling.

Discussion

Because of the widespread use of organophosphorus (OP) compounds for agricultural purposes and the lack of fully effective countermeasures, OP poisoning remains a major public health issue worldwide, with several million intoxications and over 200,000 deaths reported each year^{37,38}, emphasizing the need for fully efficient antidotes to alleviate OP toxicity. To help fill this gap, we used the possibilities offered by zebrafish larvae and developed a vertebrate model of OP poisoning to investigate the consequences of OP exposure on neuronal functions and neuronal network activity. As an OP compound, we chose DFP, a moderately toxic compound previously used for OP toxicology research³⁹. In good agreement with the results gained with rodent OP poisoning models^{6,40}, zebrafish larvae exposed to DFP displayed marked AChE inhibition and muscle paralysis, two important hallmarks of OP poisoning. More importantly, unlike rodent OP intoxication models, in which premature death due to respiratory failure must imperatively be prevented by the simultaneous addition of low dose atropine and oximes, there is no need to treat DFP-exposed zebrafish with acetylcholine modulators, making DFP-exposed zebrafish larvae an accurate animal model to investigate the pathophysiology of OP poisoning. In particular, as a pure OP poisoning model, zebrafish larvae also offer a powerful tool to test the effects of anti-convulsive agents or other OP antidotes, in the absence of either muscarinic antagonists or cholinesterase reactivators.

Previous results in both humans and rodent models have shown that acute OP poisoning causes neuronal hyperexcitation leading to epileptic seizures⁶. In good agreement with this observation, we first observed that zebrafish larvae exposed to DFP displayed a considerably increased accumulation of the Fos protein in brain neurons. *c-Fos* is a member of the IEG family, widely used as a molecular marker of neuronal activity, and



◀ **Figure 3.** DFP exposure caused neuronal hyperexcitation. **(a)** As experimental set-up, 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae were exposed to either 15 μ M DFP or vehicle (1% DMSO), and calcium transients were recorded in brain neurons during the next 6 h. **(b)** Scheme of a 5 dpf larva head with the red box showing the region of interest in the brain, uncovering the optic tectum (OT). **(c,d)** Snapshot views of calcium imaging in a 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larva brain showing baseline calcium transients **(c** in Fig. 2e) and seizure-like hyperactivity seen 3 h after exposure to 15 μ M DFP **(d** in Fig. 2f). **(e,f)** Baseline calcium transients detected in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] control larvae ($n=3$) **(e)** and massive calcium transients detected in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae exposed for 6 h to 15 μ M DFP ($n=4$) **(f)**. **(g)** Amplitude of calcium transients detected in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae at different time points following exposure to either 15 μ M DFP ($n=4$) or vehicle ($n=3$) (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test: n.s., non-significant; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). **(h)** Number of calcium transients showing $\Delta F/F_0 > 0.04$ in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae at different time points following exposure to either 15 μ M DFP ($n=4$) or vehicle ($n=3$) (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test: n.s., non-significant; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$). **(i)** Pattern of calcium transients seen in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae exposed for 5 h to 15 μ M DFP and then to 15 μ M DFP + 40 μ M diazepam (DZP) for an additional hour. **(j)** Number of calcium transients showing $\Delta F/F_0 > 0.04$ in 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae exposed for 5 h to 15 μ M DFP and then to 15 μ M DFP + 40 μ M diazepam (DZP) for an additional hour ($n=6$) (Student's unpaired t -test: **, $p < 0.01$).

overexpressed in a large number of animal epilepsy models^{41–43}, suggesting that acute DFP exposure causes neuronal hyperexcitation. Using qRT-PCR analysis we next showed that DFP exposure also induced a massive accumulation of transcripts of the IEGs *fosab*, *atf3*, *junBa*, and *npas4b*, providing another indication that DFP induces a massive neuronal hyperexcitation in zebrafish larvae. To further investigate whether DFP exposure causes neuronal hyperexcitation, we used calcium imaging, a recent technology that enables the visualization of neuronal excitation and epileptic seizures in living zebrafish larvae^{14,27,44}. Interestingly, in larvae exposed to acute DFP poisoning, we observed a massive increase in the number of neuronal calcium transients compared to those seen in controls, and also a significant increase in the amplitude of the transients in DFP-treated larvae. Last, these calcium transients detected in brain neurons of DFP-exposed larvae were significantly diminished after addition of diazepam, a GABA receptor agonist. Altogether, these observations demonstrate that after acute DFP poisoning, zebrafish larvae display epileptiform neuronal hyperexcitation. In humans suffering from acute OP intoxication, whenever neuronal hyperexcitation is not rapidly treated, epileptic seizures eventually develop into SE, a major life-threatening neurological condition^{6,45}, which also causes long-term brain damage^{46,47}. Interestingly, in the zebrafish model of OP poisoning presented here, we observed that almost all the larvae displayed numerous massive calcium transients from 2 to 3 h after DFP exposure onward, which were strongly reminiscent of those associated with generalized seizures seen in both genetic and pharmacological zebrafish epilepsy models^{14,27}. Altogether, these findings strongly suggest that DFP exposure causes epileptiform neuronal hyperexcitation in zebrafish larvae, eventually leading to a status epilepticus-like condition. This validated DFP model could be used to identify novel OP antidotes, and especially neuroprotective entities preventing the long-lasting neuronal morbidities associated with OP exposure. In particular, new AChE reactivators or other efficient countermeasures could be identified on the basis of their ability to restore locomotor activity or counteract epileptogenic effects of OP poisoning.

Together with AChE inhibition and epileptic seizures, massive neuronal death is another hallmark of OP poisoning²³ also observed in DFP-exposed zebrafish larvae, as demonstrated by acridine orange staining and Act-casp3 immunocytochemistry, two markers of late and mid-early apoptosis stages, respectively. Importantly, given that the number of Act-casp3 positive cells was approximately doubled only 6 h after OP addition, and that the cleavage of Pro-Caspase 3 into Act-casp3 is a mid-early stage event in the intrinsic apoptotic cascade, these data suggest that DFP-induced neuronal apoptosis is initiated in the very first hours that follow OP poisoning, a time frame also matching the massive calcium transients seen in DFP-treated individuals. Altogether, these results suggest that the increased rate of neuronal apoptosis seen in DFP-treated individuals was a consequence of glutamate excitotoxicity due to epileptiform neuronal hyperexcitation. Alterations in proteolytic cleavage of pro-caspase 1 and 3 have already been described in different experimental epilepsy models^{48,49}. However, the relationship between neuronal excitation, glutamate excitotoxicity and neuronal apoptosis remains poorly understood. At the cellular level, it has long been known that epileptiform neuronal hyperexcitation relies on massive glutamate releases, inducing glutamate receptor over-activation at glutamatergic excitatory synapses^{34–36}. In the case of OP poisoning, it has been shown that acute OP intoxication induces activation of NMDA receptors⁵⁰, which in turn causes neuronal seizures and apoptosis^{46,51}. Interestingly, in the model of OP poisoning presented here, hyperexcitation of brain neurons was correlated with both increased accumulation of the NR2B subunit of excitatory NMDA receptor and decreased accumulation of gephyrin and GAD65/67 proteins, two important components of GABAergic inhibitory signaling. These results suggest that after DFP poisoning, neuronal hyperexcitation is due to a shift in the glutamatergic/GABAergic activity balance of brain neurons toward excitatory states.

We report here on a zebrafish model of OP poisoning that faithfully recapitulates the neuronal deficits observed in humans, including AChE inhibition, epileptiform neuronal hyperexcitation, and neuronal apoptosis. Moreover, this vertebrate model does not require the simultaneous addition of acetylcholine modulators, unlike rodent models of OP poisoning, thus providing a pure and accurate model for large-scale in vivo screening of entities that could restore CNS functions after OP poisoning and alleviate the long-term neurological sequelae of such intoxication.

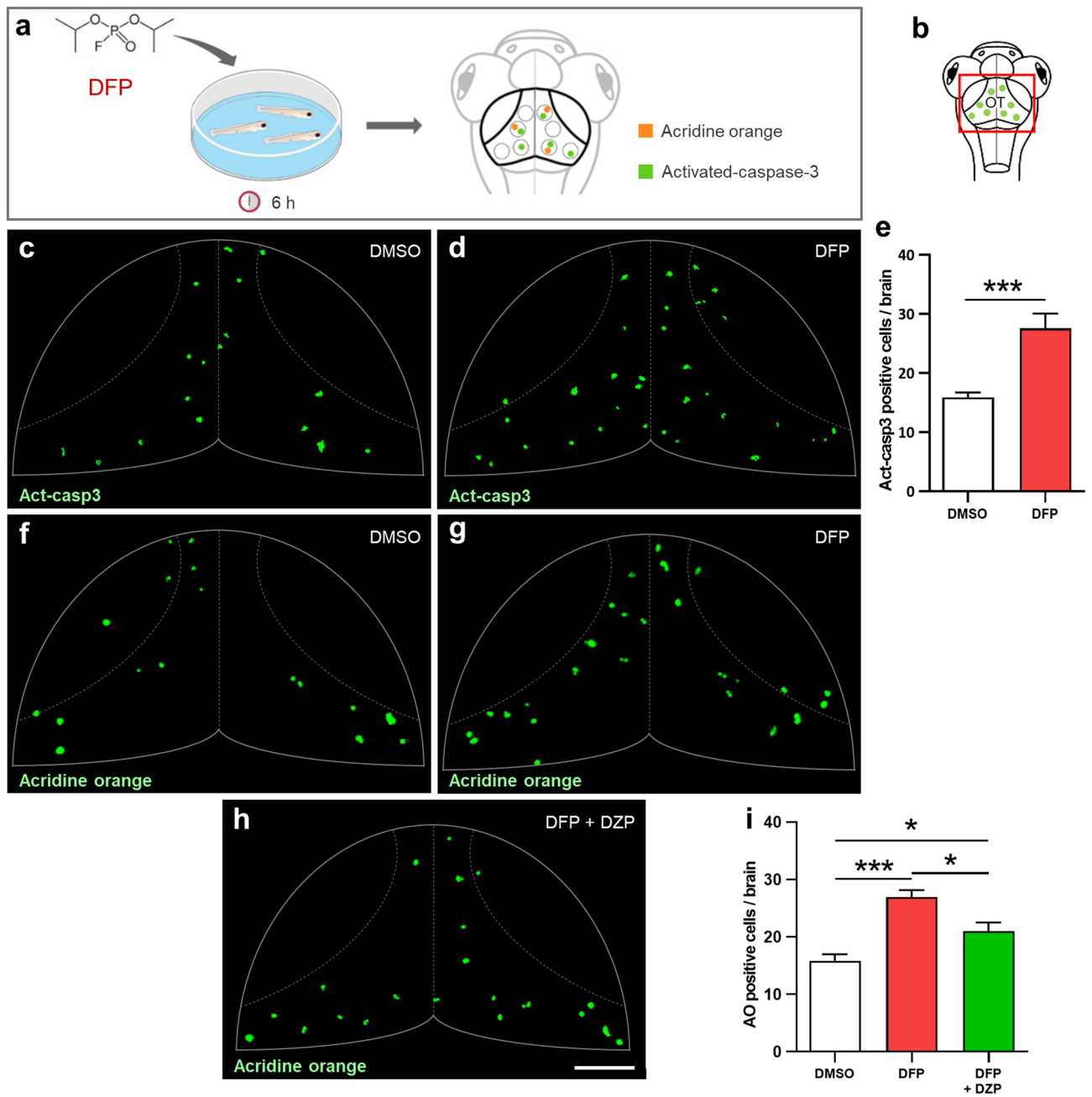


Figure 4. DFP exposure increased cell apoptosis. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to either 15 μM DFP or vehicle (1% DMSO) for 6 h, before processing for either acridine orange (AO) staining or anti-activated caspase-3 (Act-casp3) immunolabeling. (b) Scheme of a 5 dpf larva head with the red box showing the region of interest in the brain, uncovering the optic tectum (OT). (c,d) Act-casp3 immunolabeling of OT neurons in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle (c) or 15 μM DFP (d). (e) Quantification of Act-casp3-positive neurons in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either 15 μM DFP ($n = 12$) or vehicle ($n = 12$) (Student's unpaired t -test with Welch's correction: ***, $p < 0.001$). (f-h) Visualization of AO-labeled apoptotic neurons in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle (f), or 15 μM DFP (g) or 15 μM DFP + 40 μM diazepam (h). (i) Quantification of the number of acridine orange positive cells in 5 dpf larvae exposed for 6 h to either vehicle ($n = 24$), or 15 μM DFP ($n = 17$) or 15 μM DFP + 40 μM diazepam (DZP) ($n = 10$) (one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$). Scale bar: 50 μm .

Materials and methods

Fish husbandry and zebrafish lines. Zebrafish were kept at 26–28 $^{\circ}\text{C}$ in a 14 h light/10 h dark cycle. Embryos were collected by natural spawning and raised in E3 solution at 28.5 $^{\circ}\text{C}$. To inhibit embryo pigmentation, 0.003% 1-phenyl-2-thiourea was added at 1-day post-fertilization (dpf). Wild-type AB fish was originally purchased from the Zebrafish International Resource Center (Eugene, OR, USA) and Tg[HuC:GCaMP5G] transgenic line⁵² was a gift from Dr. George Debréguas (Laboratoire Jean Perrin, Paris). These lines were raised

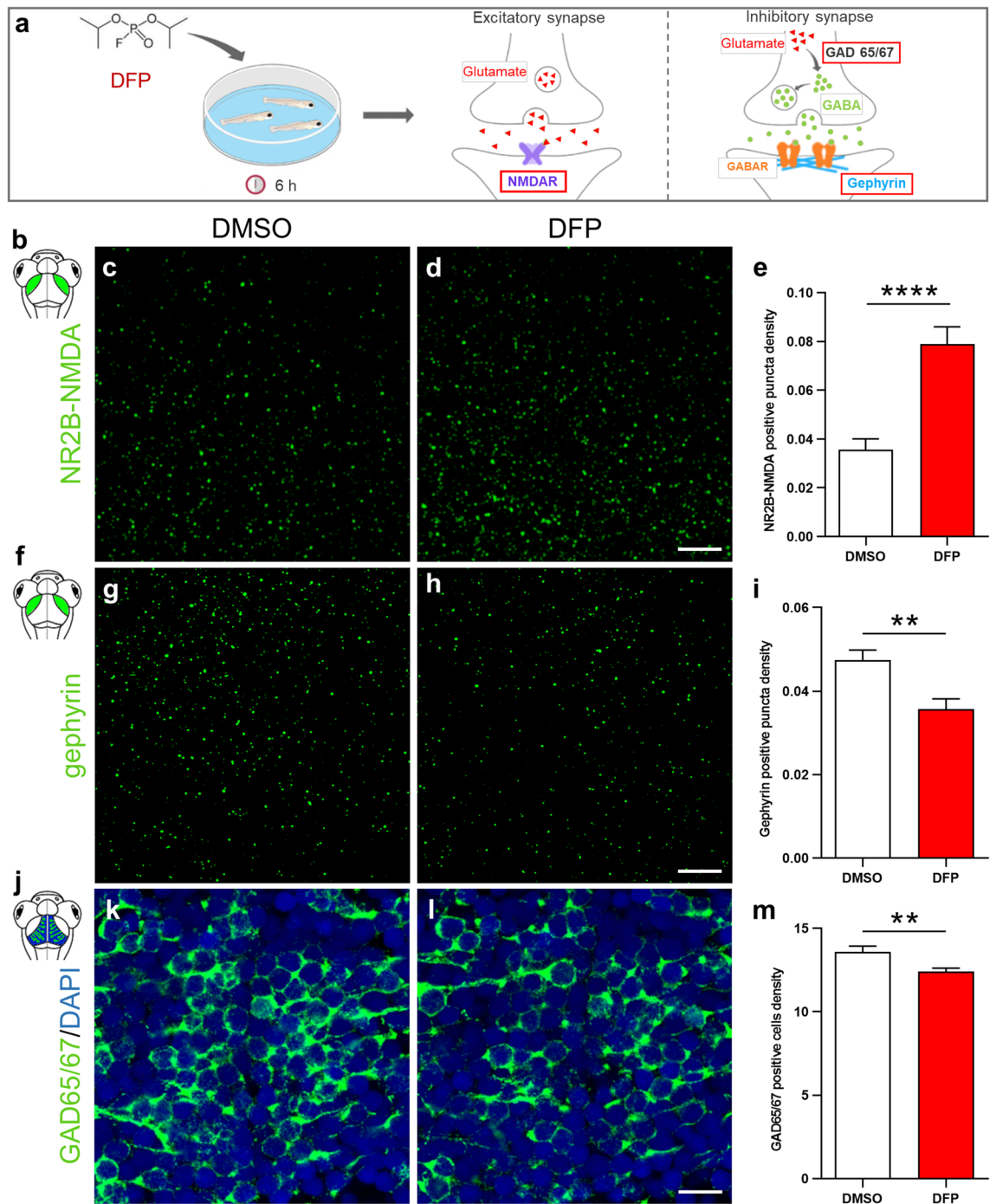


Figure 5. DFP exposure caused increased NR2B-NMDA subunit receptor accumulation combined with decreased gephyrin and GABA signaling. **(a)** As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to either 15 μ M DFP or vehicle (DMSO) for 6 h, prior to being processed for NR2B-NMDA, gephyrin or GAD 65/67 immunolabeling. **(b)** Scheme of 5 dpf larva head highlighting the tectal neuropils in green. **(c,d)** NR2B-NMDA receptor immunolabelling of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO **(c)** or 15 μ M DFP **(d)**. Scale bar: 5 μ m. **(e)** Quantification of NR2B-NMDA puncta density in 5 dpf larvae treated for 6 h with either DMSO ($N=4$; $n=22$) or 15 μ M DFP ($N=4$; $n=26$) (Mann Whitney: ****, $p<0.0001$). **(f)** Scheme of 5 dpf larva head highlighting the tectal neuropils in green. **(g,h)** Gephyrin immunolabelling of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO **(g)** or 15 μ M DFP **(h)**. Scale bar: 5 μ m. **(i)** Quantification of gephyrin puncta density in 5 dpf larvae treated for 6 h with either DMSO ($N=4$; $n=18$) or 15 μ M DFP ($N=4$; $n=18$) (Student unpaired t -test: **, $p<0.01$). **(j)** Scheme of 5 dpf larva head highlighting stratum periventriculare in blue and green. **(k,l)** GAD65/67 immunolabelling of neurons in the optic tectum of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO **(k)** or 15 μ M DFP **(l)**. Scale bar: 10 μ m. **(m)** Quantification of the density of neurons expressing GAD65/67 protein in the optic tectum of 5 dpf larvae exposed to either DMSO ($N=4$; $n=18$) or 15 μ M DFP ($N=4$; $n=19$) (Student unpaired t -test: **, $p<0.01$). N =number of larvae and n =number of slices.

in our facility. All animal experiments were conducted at the French National Institute of Health and Medical Research (Inserm) UMR 1141 in Paris in accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm), and were approved by the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

DFP treatment. Diisopropylfluorophosphate (DFP) was purchased from Sigma Aldrich. A stock solution (5.46 mM), stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, was diluted extemporaneously to $15\text{ }\mu\text{M}$ in 1% DMSO/E3 medium. Control zebrafish larvae were treated with 1% DMSO/E3 medium.

Measurement of DFP stability (see supplementary Materials & Methods).

Morphological analysis. Five dpf larvae were anesthetized and lateral views of the whole body were acquired using a Zeiss Stereomicroscope at the same magnification. Body length, eye size, and head size were then measured using ImageJ 1.52p (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Body length was measured from the anterior tip of the body to the caudal peduncle. Eye size and brain surface area were measured by specifying the eye and brain boundaries.

Hematoxylin/eosin staining (see supplementary Materials & Methods).

Measurement of AChE activity (see supplementary Materials & Methods).

Zebrafish larval locomotor activity. Larvae locomotor activity was measured, as previously described¹⁴, using a ZebraBox (View Point), an automated infrared tracking device, with ZebraLab 5.13.0.240 software (<https://www.viewpoint.fr/en/home>). Five dpf larvae were individually dispatched in a 96-well plate in approximately $200\text{ }\mu\text{l}$ of E3 medium containing either 1% DMSO or $15\text{ }\mu\text{M}$ DFP. The plate was then placed in the recording chamber for a 30-min habituation in the dark and in silence. Locomotor activity was then recorded for 4 h using the following settings: animal color was set to black and threshold detection to 12. The locomotion activity was quantified as the sum of all pixels showing intensity changes during the recording time and plotted as “acting units”.

qRT-PCR. For RNA isolation, larvae were homogenized using a syringe equipped with a 26G needle (7 larvae per sample) using the RNA XS Plus kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNAs were synthesized using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and qPCR was performed using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Samples were run in triplicate. Expression levels were normalized to that of the *tbp* gene. The primers (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) used are listed in Supplementary Table 1.

Neuronal calcium transient imaging. Calcium activity was recorded and quantified as previously described in Brenet et al. (2019)¹⁴. Five dpf larvae were paralyzed using $300\text{ }\mu\text{M}$ pancuronium bromide (PB) and embedded in 1.3% low-melting agarose in the center of a 35 mm glass-bottomed dish, and then covered with 3 mL of E3 solution containing $300\text{ }\mu\text{M}$ PB. The recording chamber was then placed under a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a $20\times/0.75$ multi-immersion objective. Vehicle (1% DMSO) or DFP ($15\text{ }\mu\text{M}$) was added to the E3 medium and calcium activity was recorded for 6 h. Calcium fluorescent signals were recorded on a single focal plan, located approximately in the middle of the optic tectum, at a 512×512 -pixel image resolution and a frame rate of 2 images per second. Fluorescence intensity of each frame was measured using a homemade macro on ImageJ 1.52p (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Fluorescence variations ($\Delta F/F_0$) were calculated using Microsoft Excel (for Windows 2013, version 15.0.4569.1506) by subtracting the mean fluorescence intensity of all frames (F_0) and dividing the results by F_0 . A subtraction of the mean value of the lowest (all values under the median) within a 20 s sliding window around the point was finally applied to correct the fluorescence drift occurring during long calcium recordings. Fluorescence variations greater than $0.04\text{ }\Delta F/F_0$ were considered as calcium events upon visual confirmation since the detection system may detect false events.

Diazepam treatment. 5 dpf Tg[Huc:GCaMP5G] larvae were exposed to $15\text{ }\mu\text{M}$ DFP for 5 h, PB-paralyzed and embedded in 1.1% low-melting agarose in the center of a 35 mm glass-bottomed dish, and then covered with an E3 solution containing $15\text{ }\mu\text{M}$ DFP and $300\text{ }\mu\text{M}$ PB. Calcium transients were first monitored for 30 min. Diazepam ($40\text{ }\mu\text{M}$ DZP, Sigma) was then added and calcium transients were recorded for an additional hour. Visualization and recording of calcium transients were carried out as described above.

Acridine orange labeling of apoptotic cells. To quantify neuronal cell death, we used in vivo acridine orange (AO) staining of fragmented DNA molecules in apoptotic cells. Five dpf larvae treated with either vehicle or DFP were incubated for 30 min in AO (1/2000, VectaCell), thoroughly washed several times, PB-paralyzed and agar-embedded. $120\text{ }\mu\text{m}$ stacks of brain sections were then acquired using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a $20\times/0.75$ multi-immersion objective. In addition to AO staining, brains were stained with anti-activated-caspase-3 and processed as previously described¹⁴ (see supplementary Materials & Methods).

Immunohistochemistry (see also Supplementary Table 2 for details on antibodies used). For protein immunodetection, zebrafish larvae were fixed in 4% formaldehyde, incubated overnight in 15% sucrose

at 4 °C, embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose solution, flash frozen in isopentane at –45 °C and stored at –80 °C until use. For gephyrin immunodetection, unfixed larvae were directly incubated for 30 min in 15% sucrose at room temperature and then embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose solution, flash frozen in isopentane at –45 °C and stored at –80 °C until use. Frozen embedded larvae were cut into 20 µm cryostat sections. For Fosab staining, we strictly applied the protocol described by Chatterjee et al. (2015)⁵³. For anti-GAD65/67 and anti-gephyrin immunolabeling, we used the endogenous biotin blocking procedure (Avidin/Biotin Blocking Kit, Dako, code No. X0590) according to the manufacturer's instructions. Sections were then blocked and permeabilized with 0.2% gelatine, 0.25% Triton X100 diluted in 1X PBS for 1 h at room temperature and then incubated overnight at room temperature with either anti-GAD65/67 (1:300) or anti-gephyrin (1:100). After several washes, GAD65/67 and gephyrin proteins were detected using biotinylated goat anti-rabbit and streptavidine Alexa 488 (Molecular Probes; catalog No. S32355; used at 1:400 dilution). Sections were counterstained for 10 min with 0.1% DAPI (Sigma, St. Louis, MO). For anti-NMDA-NR2B, immunohistochemistry was performed as previously described⁵⁴. Briefly, brain tissue sections were blocked and permeabilized with 0.2% gelatin, 0.25% Triton X100 diluted in PBS for 1 h at room temperature and then incubated overnight at room temperature with anti-NMDA-NR2B antibody (1:300). After several washes, sections were incubated for 1 h with anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 488. Sections were counterstained for 10 min with DAPI (Sigma-Aldrich, used at 1:3000) before mounting.

Quantification of NR2B and gephyrin puncta labeling. Sections stained with anti-NR2B-NMDA and anti-gephyrin antibodies were imaged at full resolution (voxel size: 0.063 × 0.063 × 0.3 µm) using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 63×/1.4 oil-immersion objective. Images were then processed with AutoQuant X3.1 software (<https://www.mediacy.com/autoquantx3>) and the density of NR2B or gephyrin labeled puncta was quantified using a homemade ImageJ macro (Zsolt Csaba, Inserm UMR1141). After stacking all images, a median filter was applied, a threshold on the fluorescence intensity was then set to select NR2B-NMDA or gephyrin puncta. Puncta were identified as accumulation of more than two pixels (0.126 µm) in diameter, which lead to an average punctum size of 0.34 µm. The density of NR2B-NMDA or gephyrin puncta were calculated by dividing the number of labeled puncta detected in the tectal neuropil by the surface area of this region.

Quantification of Fosab- and GAD65/67-positive neuron density. Sections hybridized with anti-Fosab and anti-GAD65/67 antibodies were imaged using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 40×/1.3 oil-immersion objective. The neurons expressing Fosab or GAD65/67 were manually counted with ImageJ 1.52p (<https://imagej.nih.gov/ij/>) on sections of optic tectum or telencephalon. The number of positive neurons was then divided by the surface area of the corresponding regions to calculate a density of neurons expressing those proteins in larvae exposed to DFP or vehicle.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.4.3.686 (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>). Data were first challenged for normality using the Shapiro–Wilk test. Data with a normal distribution were analyzed by a two-tailed unpaired *t*-test. Data not showing normal distribution were analyzed using a two-tailed Mann–Whitney test. All graphs show mean ± s.e.m.

Data availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 5 March 2020; Accepted: 19 October 2020

Published online: 05 November 2020

References

- Mew, E. J. et al. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006–15: systematic review. *J. Affect. Disord.* **219**, 93–104 (2017).
- Konickx, L. A. et al. Reactivation of plasma butyrylcholinesterase by pralidoxime chloride in patients poisoned by WHO class II toxicity organophosphorus insecticides. *Toxicol. Sci.* <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft217> (2013).
- Pereira, E. F. R. et al. Animal models that best reproduce the clinical manifestations of human intoxication with organophosphorus compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **350**, 313–321 (2014).
- Jett, D. A. Neurological aspects of chemical terrorism. *Ann. Neurol.* **61**, 9–13 (2007).
- Lotti, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (ed. Krieger, R.) 1543–1589 (Elsevier, Amsterdam, 2010). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00072-0>.
- Todorovic, M. S., Cowan, M. L., Balint, C. A., Sun, C. & Kapur, J. Characterization of status epilepticus induced by two organophosphates in rats. *Epilepsy Res.* **101**, 268–276 (2012).
- Chen, Y. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *Neurotoxicology* **33**, 391–400 (2012).
- Collombet, J.-M. Nerve agent intoxication: recent neuropathophysiological findings and subsequent impact on medical management prospects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.07.003> (2011).
- Li, Y. et al. Spatiotemporal pattern of neuronal injury induced by DFP in rats: a model for delayed neuronal cell death following acute OP intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **253**, 261–269 (2011).
- McDonough, J. H. & Shih, T. M. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 559–579 (1997).
- Yamasue, H. et al. Human brain structural change related to acute single exposure to sarin. *Ann. Neurol.* **61**, 37–46 (2007).
- Yanicostas, C., Ernest, S., Dayraud, C., Petit, C. & Soussi-Yanicostas, N. Essential requirement for zebrafish anosmin-1a in the migration of the posterior lateral line primordium. *Dev. Biol.* **320**, 469–479 (2008).

13. Martin, E. *et al.* Spatacsin and spastizin act in the same pathway required for proper spinal motor neuron axon outgrowth in zebrafish. *Neurobiol. Dis.* **48**, 299–308 (2012).
14. Brenet, A., Hassan-Abdi, R., Somkhit, J., Yanicostas, C. & Soussi-Yanicostas, N. Defective excitatory/inhibitory synaptic balance and increased neuron apoptosis in a zebrafish model of dravet syndrome. *Cells* **8**, 1199 (2019).
15. Ghomid, J. *et al.* ZEB2 zinc-finger missense mutations lead to hypomorphic alleles and a mild Mowat-Wilson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2652–2661 (2013).
16. Yanicostas, C. *et al.* Requirement for Zebrafish ataxin-7 in differentiation of photoreceptors and cerebellar neurons. *PLoS ONE* **7**, e50705 (2012).
17. MacRae, C. A. & Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 721–731 (2015).
18. Lessman, C. A. The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **93**, 268–280 (2011).
19. Delvecchio, C., Tiefenbach, J. & Krause, H. M. The Zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 354–361 (2011).
20. Rinkwitz, S., Mourrain, P. & Becker, T. S. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog. Neurobiol.* **93**, 231–243 (2011).
21. Ito, H. & Yamamoto, N. Non-laminar cerebral cortex in teleost fishes?. *Biol. Lett.* **5**, 117–121 (2009).
22. Wullimann, M. F. Secondary neurogenesis and telencephalic organization in zebrafish and mice: a brief review. *Integr. Zool.* **4**, 123–133 (2009).
23. Flannery, B. M. *et al.* Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication. *J. Neuroinflammation* **13**, 1–16 (2016).
24. Dragunow, M., Yamada, N., Bilkey, D. K. & Lawlor, P. Induction of immediate-early gene proteins in dentate granule cells and somatostatin interneurons after hippocampal seizures. *Mol. Brain Res.* **13**, 119–126 (1992).
25. Lösing, P. *et al.* SRF modulates seizure occurrence, activity induced gene transcription and hippocampal circuit reorganization in the mouse pilocarpine epilepsy model. *Mol. Brain* **10**, 1–22 (2017).
26. Szyndler, J. *et al.* Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylene-tetrazol-kindled seizures. *Epilepsy Behav.* **16**, 216–224 (2009).
27. Liu, J. & Baraban, S. C. Network properties revealed during multi-scale calcium imaging of seizure activity in zebrafish. *eNeuro* **6**, ENEURO.0041-19.2019 (2019).
28. Verrotti, A., Milioni, M. & Zaccara, G. Safety and efficacy of diazepam autoinjector for the management of epilepsy. *Exp. Rev. Neurother.* **15**, 127–133 (2014).
29. Petras, J. M. Neurology and neuropathology of soman-induced brain injury: an overview. *J. Exp. Anal. Behav.* **61**, 319–329 (1994).
30. Shih, T.-M., Duniho, S. M. & McDonough, J. H. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00019-X) (2003).
31. Kim, Y. B. *et al.* Organophosphate-induced brain injuries: delayed apoptosis mediated by nitric oxide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **7**, 147–152 (1999).
32. Kaur, P., Radotra, B., Minz, R. W. & Gill, K. D. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *Neurotoxicology* **28**, 1208–1219 (2007).
33. Gunay, N. *et al.* Protective effects of Y-27632 on acute dichlorvos poisoning in rats. *Am. J. Emerg. Med.* **28**, 268–274 (2010).
34. Lallement, G. *et al.* Involvement of the different rat hippocampal glutamatergic receptors in development of seizures induced by soman: an autoradiographic study. *Neurotoxicology* **12**, 655–664 (1991).
35. Lallement, G. *et al.* Involvement of glutamatergic system of amygdala in generalized seizures induced by soman: comparison with the hippocampus. *C. R. Acad. Sci. III* **313**, 421–426 (1991).
36. Lallement, G. *et al.* Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Res.* **563**, 234–240 (1991).
37. Dawson, A. H. *et al.* Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med.* **7**, e1000357 (2010).
38. Bertolote, J. M., Fleischmann, A., Eddleston, M. & Gunnell, D. Deaths from pesticide poisoning: a global response. *Br. J. Psychiatry* **189**, 201–203 (2006).
39. Saunders, B. *Some Aspects of the Chemistry and Toxic Action of Organic Compounds Containing Phosphorus and Fluorine* (Cambridge University Press Wiley, New York, 1957).
40. McCarren, H. S. & McDonough, J. H. Anticonvulsant discovery through animal models of status epilepticus induced by organophosphorus nerve agents and pesticides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1374**, 144–150 (2016).
41. Dragunow, M. & Robertson, H. A. Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* **329**, 441–442 (1987).
42. Le Gal, G. & Salle, L. Long-lasting and sequential increase of c-fos oncoprotein expression in kainic acid-induced status epilepticus. *Neurosci. Lett.* **88**, 127–130 (1988).
43. Simler, S. *et al.* C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci. Lett.* **175**, 58–62 (1994).
44. Diaz Verdugo, C. *et al.* Glia-neuron interactions underlie state transitions to generalized seizures. *Nat. Commun.* **10**, 1–13 (2019).
45. Trinka, E. *et al.* A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* **56**, 1515–1523 (2015).
46. Shih, T. M. & McDonough, J. H. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J. Appl. Toxicol.* **17**, 255–264 (1997).
47. Tryphonas, L. & Clement, J. G. Histomorphogenesis of soman-induced encephalocardiomyopathy in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.* **23**, 393–409 (1995).
48. Henshall, D. C., Chen, J. & Simon, R. P. Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. *J. Neurochem.* **74**, 1215–1223 (2000).
49. Narkilahti, S., Pirttila, T. J., Lukasiuk, K., Tuunanen, J. & Pitkanen, A. Expression and activation of caspase 3 following status epilepticus in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1486–1496 (2003).
50. Kaur, S., Singh, S., Chahal, K. S. & Prakash, A. Potential pharmacological strategies for the improved treatment of organophosphate-induced neurotoxicity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 893–911 (2014).
51. Solberg, Y. & Belkin, M. The role of excitotoxicity in organophosphorous nerve agents central poisoning. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 183–185 (1997).
52. Akerboom, J. *et al.* Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2601-12.2012> (2012).
53. Chatterjee, D., Tran, S., Shams, S. & Gerlai, R. A simple method for immunohistochemical staining of zebrafish brain sections for c-fos protein expression. *Zebrafish* **12**, 414–420 (2015).
54. Puverel, S., Nakatani, H., Parras, C. & Soussi-Yanicostas, N. Prokineticin receptor 2 expression identifies migrating neuroblasts and their subventricular zone transient-amplifying progenitors in adult mice. *J. Comp. Neurol.* **512**, 232–242 (2009).

Author contributions

A.B. and J.S. performed the experiments, the analysis, and designed the figures. R.H.A., A.I., D.S., C.R., O.B. and N.T. helped carry out the experiments. N.D. helped supervise the project. C.Y., G.D.B., F.N. and N.D. contributed to the final manuscript. N.S.Y. supervised the project and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76056-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.S.-Y.

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

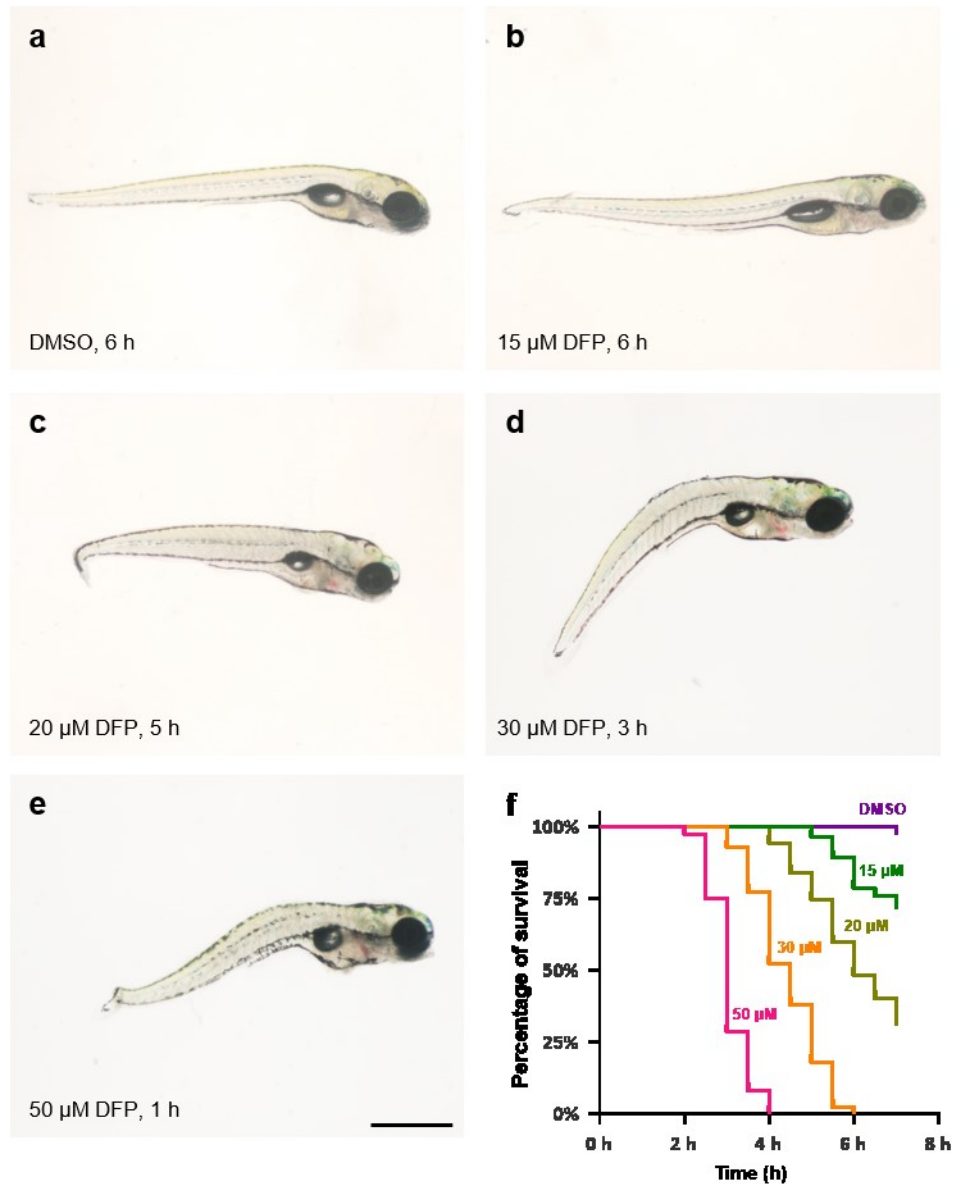
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



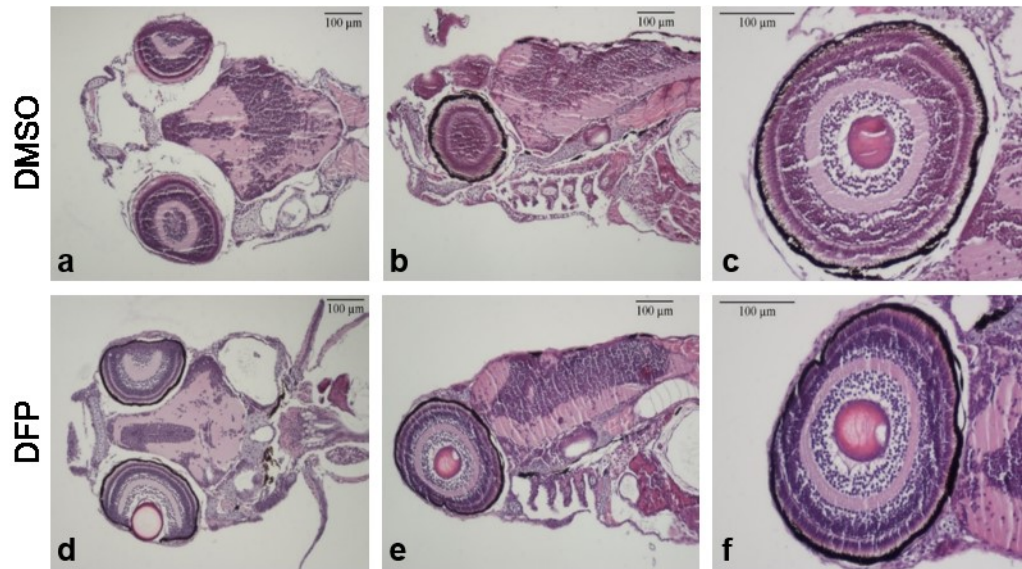
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative 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) 2020

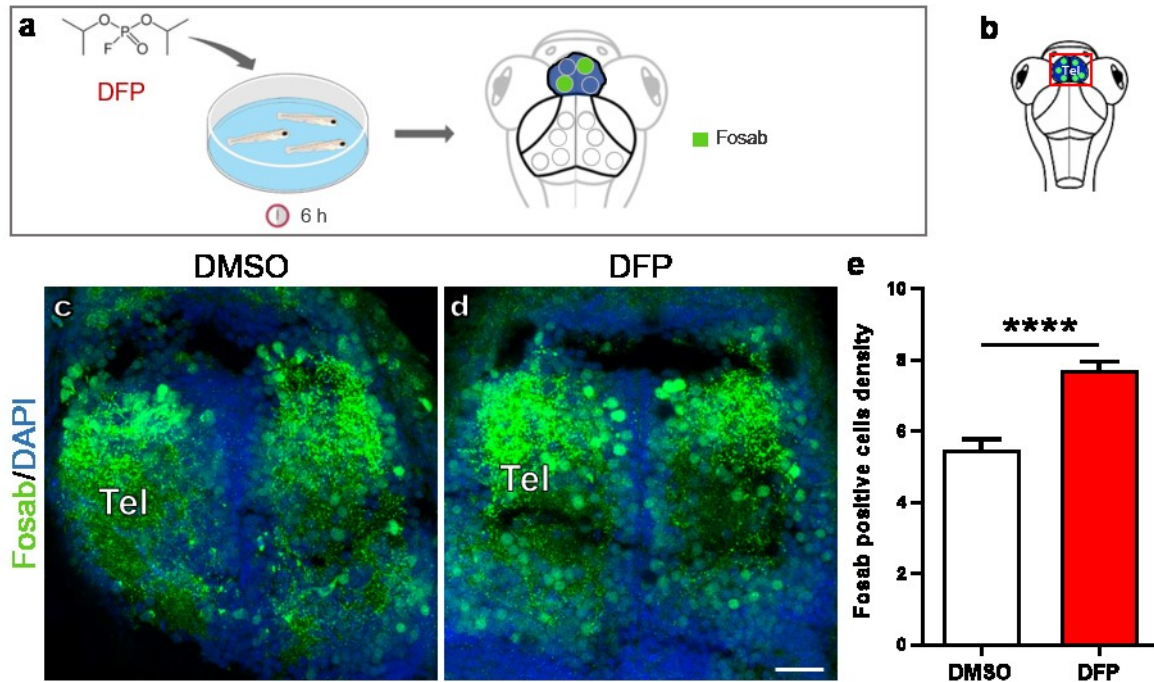
Supplementary figures



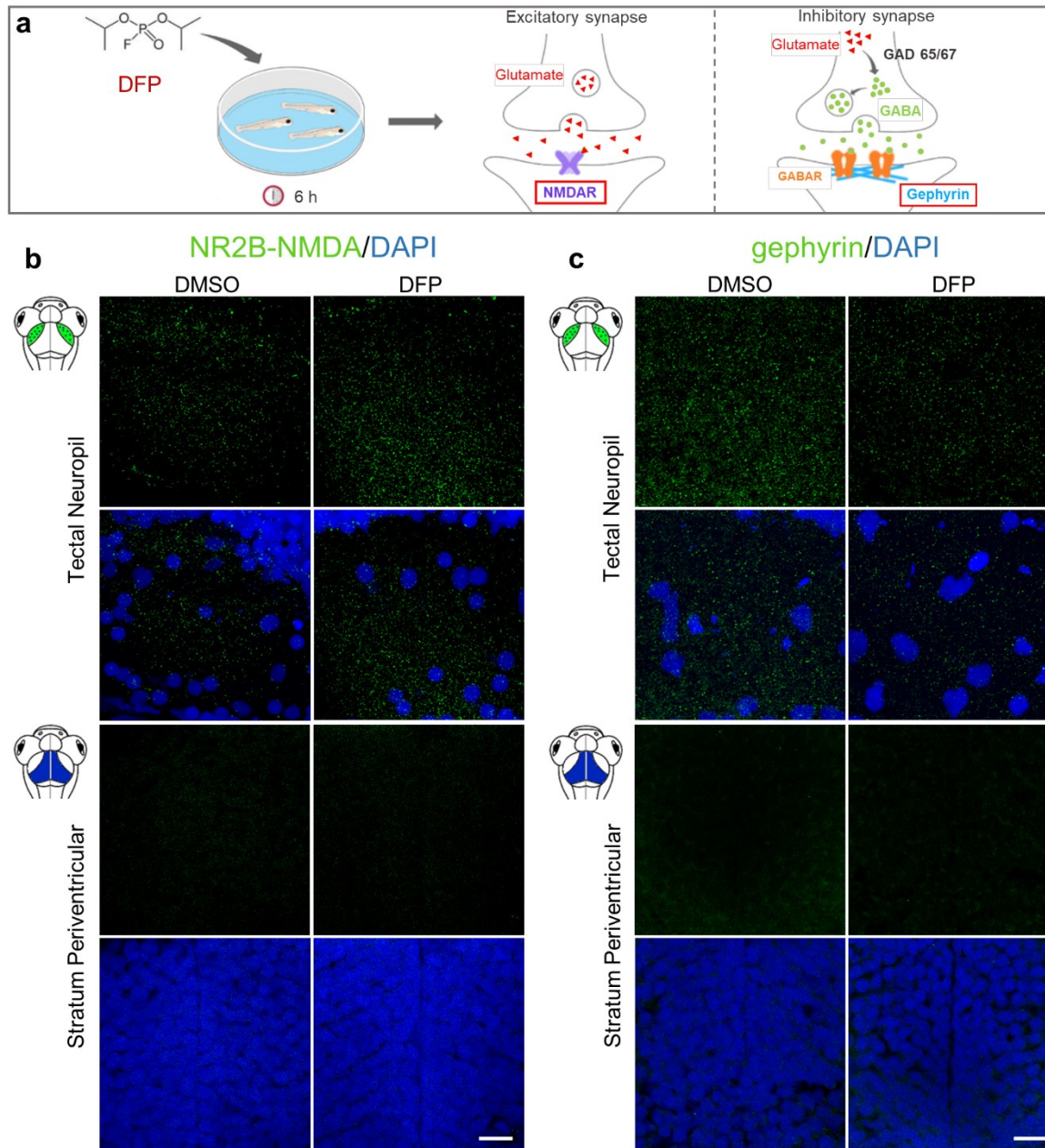
Supplementary Fig. 1. DFP exposure caused phenotypic defects and larval lethality. (a-e) Phenotypes of 5 dpf larvae exposed to either vehicle (DMSO) for 6 h (a), or 15 μ M DFP for 6 h (b), or 20 μ M DFP for 5 h (c), or 30 μ M DFP for 3 h (d), or 50 μ M for 1 h (e). Scale bar: 1 mm. (f) Survival curve of 5 dpf larvae exposed to either vehicle (DMSO) or 15, 20, 30 or 50 μ M DFP.



Supplementary Fig. 2. Zebrafish larvae exposed for 6 h to 15 μ M DFP do not show visible phenotypic defects. (a-f) Horizontal (a, d) and sagittal (b, c, e, f) tissue sections of 5 dpf larvae (a, b, d, e) and corresponding eyes (c, f), following exposure for 6 h to either vehicle (DMSO) (a, b, c) or 15 μ M DFP (d, e, f)



Supplementary Fig. 3 DFP exposure increase Fosab protein and gene expression. **(a)** In the experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to either 15 μ M DFP or vehicle (DMSO) for 6 hours, prior to being processed for either Fosab immunostaining or neuronal activity related gene expression. **(b)** Scheme of 5 dpf larvae head with the red box showing the regions of interest in the brain. **(c, d)** Fosab immunolabelling of neurons in the telencephalon of 5 dpf larvae exposed to DMSO **(c)** or 15 μ M DFP **(d)**. Scale bar: 20 μ m. **(e)** Quantification of the density of neurons expressing Fosab protein in the telencephalon of 5 dpf larvae exposed to DMSO ($N=3$; $n=8$) and 15 μ M DFP ($N=3$; $n=8$) (unpaired t -test: ****, $P < 0.0001$). N = number of larvae and n = number of slices. Abbreviation: Tel, telencephalon.



Supplementary Fig. 4 NR2B-NMDA and gephyrin immunostaining. (a) As experimental set-up, 5 dpf larvae were exposed to either 15 μ M DFP or vehicle (DMSO) for 6 hours, prior to being processed for NR2B-NMDA or gephyrin immunolabeling. (b) NR2B-NMDA immunolabeling of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO or 15 μ M DFP, showing specific protein accumulation in the tectal neuropils and its absence around cell bodies in the stratum periventricular. Scale bar: 10 μ m. (c) Gephyrin immunolabeling of 5 dpf larvae brains exposed to either DMSO or 15 μ M DFP, showing specific protein accumulation in the tectal neuropils and its absence around cell bodies in the stratum periventricular. Scale bar: 10 μ m.

PARTIE II : DÉFAUTS RESPIRATOIRES

L'intoxication aux organophosphorés peut entraîner une paralysie musculaire et notamment une paralysie respiratoire. Bien que les larves de poisson zèbre ne possèdent pas de muscles respiratoires à proprement parler, nous avons voulu caractériser la respiration des larves dans notre modèle afin de déterminer si elle était impactée par l'intoxication au DFP. Pour cela, nous avons d'abord mis au point une technique simple permettant de mesurer la consommation de dioxygène de nombreuses larves de poisson zèbre simultanément.

“A Fast, Simple, and Affordable Technique to Measure Oxygen Consumption in Living Zebrafish Embryos”

Julie Somkhit*, Roxane Loyant* Alexandre Brenet, Rahma Hassan-Abdi, Constantin Yanicostas, Mathieu Porceddu, Annie Borgne-Sanchez & Nadia Soussi-Yanicostas

*** : co-premiers auteurs**

Publié en Août 2020 dans le journal **Zebrafish**, doi : 10.1089/zeb.2020.1878

Résumé de l'article technique

La respiration est un élément essentiel chez tous les animaux. Elle désigne à la fois les échanges gazeux avec l'extérieur et les mécanismes cellulaires liés à la consommation de dioxygène, comme la respiration mitochondriale par exemple. Cette respiration peut être anormale dans de nombreuses pathologies. Son étude peut ainsi permettre d'obtenir des informations importantes sur l'état physiologique des cellules ou de l'organisme vivant étudié. Des méthodes permettant la mesure de la respiration mitochondriale et de la glycolyse existent déjà mais le coût d'un tel équipement n'est pas accessible à tous. C'est pourquoi nous avons développé une technique moins onéreuse permettant de mesurer la respiration globale des larves de poisson zèbre en utilisant un simple lecteur de plaque à fluorescence et la sonde MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay (Agilent). La fluorescence de cette sonde est inhibée par la présence de dioxygène. À mesure que le dioxygène est consommé, la sonde est libérée et devient fluorescente. Le suivi de l'intensité de fluorescence permet donc de suivre la consommation d'oxygène dans le milieu contenant les larves, ce dernier étant isolé de l'air ambiant par une couche d'huile minérale, empêchant ainsi l'apport extérieur de dioxygène.

Le principe de la technique a été testé et vérifié en exposant les larves de poisson zèbre à des inhibiteurs connus de certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

A Fast, Simple, and Affordable Technique to Measure Oxygen Consumption in Living Zebrafish Embryos

Julie Somkhit,^{1,*} Roxane Loyant,^{2,*} Alexandre Brenet,¹ Rahma Hassan-Abdi,¹ Constantin Yanicostas,¹ Mathieu Porceddu,² Annie Borgne-Sanchez,² and Nadia Soussi-Yanicostas¹

Abstract

In all animal species, oxygen consumption is a key process that is partially impaired in a large number of pathological situations and thus provides informative details on the physiopathology of the disease. In this study, we describe a simple and affordable method to precisely measure oxygen consumption in living zebrafish larvae using a spectrofluorometer and the MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay. In addition, we used zebrafish larvae treated with mitochondrial respiratory chain inhibitors, antimycin A or rotenone, to verify that our method enables precise and reliable measurements of oxygen consumption.

Keywords: respiration, zebrafish larvae, oxygen consumption

Introduction

RESPIRATION IS A KEY cellular function, which is altered in a great number of disorders and animal disease models, thus providing a meaningful window to interrogate the physiology of living cells and organisms.¹ Automated devices allowing precise measurement of both mitochondrial respiration (oxidative phosphorylation) and glycolysis have been developed in recent years, but their price and cost of usage restrain their use on a daily basis. To overcome this limitation, we describe here a simple and affordable method that allows precise measurement of oxygen consumption in living zebrafish larvae, using a simple spectrofluorometer and the MitoXpress Xtra Oxygen Consumption Assay (Agilent), a quantitative test relying on a fluorescent probe, which is quenched in a dose-dependent manner by O₂ molecules (Fig. 1A).

Results

To assess the ability of this method to detect fine changes in O₂ consumption in living zebrafish larvae, we measured O₂ consumption of pools of seven 5 days post-fertilization wild-type individuals treated with either vehicle (1% dimethyl

¹NeuroDiderot, Inserm U1141, Université de Paris, Paris, France.

²Mitologics SAS, Faculté de Médecine, Créteil, France.

*These authors contributed equally to this work.

© Julie Somkhit et al. 2020; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This Open Access article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are cited.

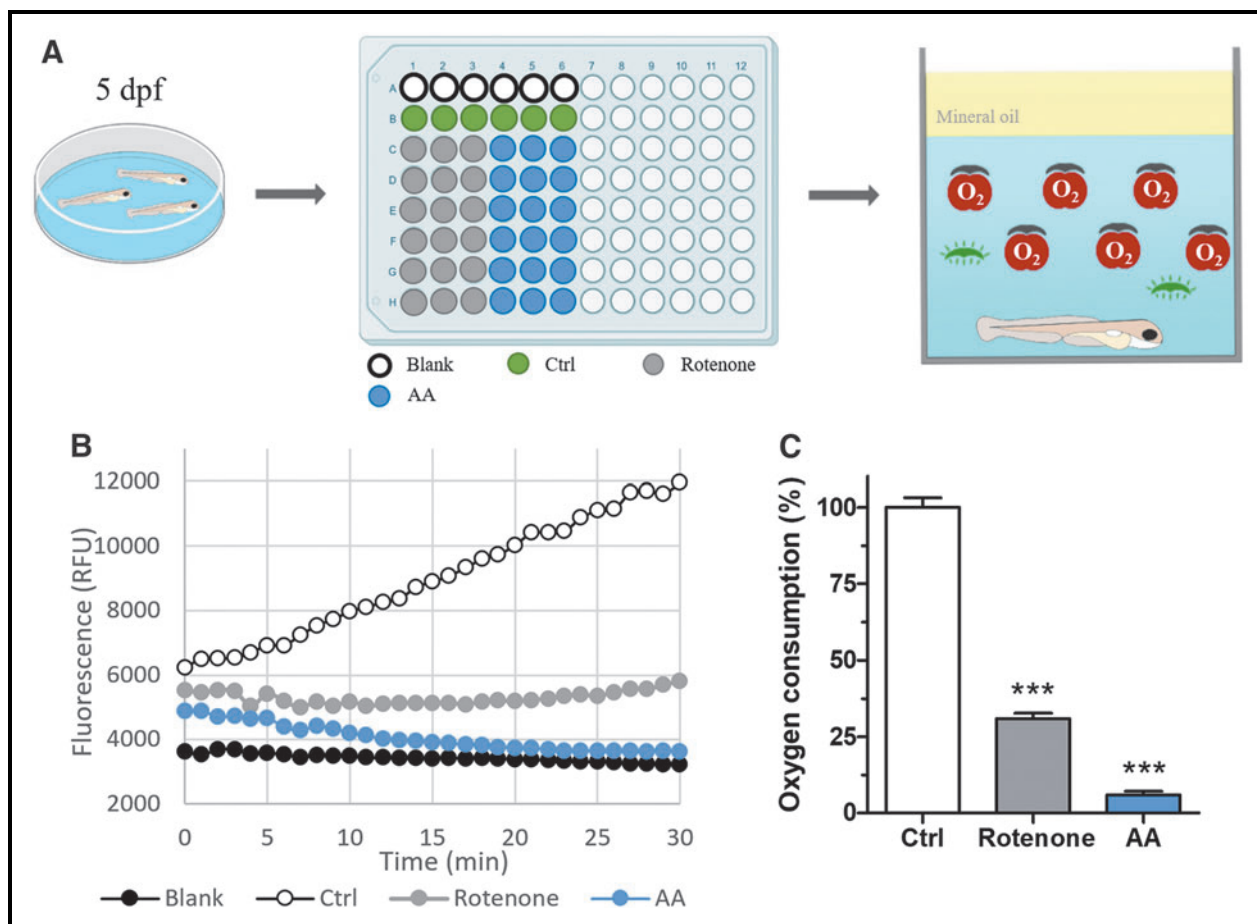


FIG. 1. Real-time measurement of oxygen consumption in 5 dpf zebrafish larvae. (A) Scheme of the experimental setup used to measure oxygen consumption *in vivo* in zebrafish larvae, treated or not with MRC inhibitors, with an example of a filled 96-well microplate. Pools of seven 5 dpf larvae treated with MRC inhibitors or untreated (control) were transferred to a 96-well microplate (Greiner Bio-One International) and then incubated in the presence of the MitoXpress Xtra probe, (Supplementary Data) a fluorescent molecule whose fluorescence is quenched in a dose-dependent manner by O₂ through direct molecular interactions, thus making fluorescence intensity inversely proportional to the amount of free O₂ dissolved in the medium. (B) Real-time measurement of the oxygen consumption in larvae exposed to MRC inhibitors or untreated, and blank (E3 medium without larva). (C) Quantification of the oxygen consumption of larvae exposed to either 2 μ M rotenone or 10 μ M AA. Whiskers represent the standard error of the mean. Rotenone ($n=36$), AA ($n=35$), control ($n=18$), and blank ($n=24$), one-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test: *** $p < 0.0001$. AA, antimycin A; ANOVA, analysis of variance; dpf, days post-fertilization; MRC, mitochondrial respiratory chain.

sulfoxide [DMSO]), 2 μ M rotenone, a specific inhibitor of the mitochondrial respiratory chain (MRC) complex I,² or 10 μ M antimycin A (AA), a specific inhibitor of the MRC complex III (Fig. 1A).^{3,4} As previously reported, we found that 1% DMSO concentration had no effect on larval development.⁵

Results showed that oxygen consumption of larvae exposed to 2 μ M rotenone and 10 μ M AA was 31% and 6%, respectively, of that observed in non-treated controls (Fig. 1B, C, Supplementary Data), indicating that the method described allows reliable measurements of oxygen consumption. Thus, this simple and direct method can be used to measure respiration *in vivo* in zebrafish intoxication and disease models.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE18-0010 MITOXDRUGS).

Supplementary Material

Supplementary Data

References

1. Frazier AE, Thorburn DR, Compton AG. Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J Biol Chem* 2019;294:5386–5395.
2. Lindahl PE, Öberg KE. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp Cell Res* 1961;23:228–237.
3. Huang LS, Cobessi D, Tung EY, Berry EA. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial Bc1 complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol* 2005;351:573–597.
4. Rieske JS. Inhibitors of respiration at energy-coupling site 2 of the respiratory chain. *Pharmacol Ther* 1980;11:415–450.
5. Alavi Naini SM, Yanicostas C, Hassan-Abdi R, Blondeel S, Bennis M, Weiss RJ, *et al.* Surfen and oxalyl surfen decrease tau hyperphosphorylation and mitigate neuron deficits in vivo in a vertebrate model of tauopathy. *Transl Neurodegener* 2018;7:6.

Address correspondence to:
Nadia Soussi-Yanicostas
NeuroDiderot
NeuroDiderot, INSERM U1141
Hôpital Robert Debré
48 Boulevard Sérurier
Paris F-75019
France

E-mail: nadia.soussi@inserm.fr

Supplementary Data

Preparation of Larvae

Pools of seven 5 days post-fertilization larvae were transferred into the wells of a 96-well plate containing 200 μL of E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl_2 , and 0.33 mM MgSO_4). After 1 h of habituation, 110 μL of E3 medium was removed from each well, and 10 μL of a mixture containing 10 \times mitochondrial respiratory chain inhibitor and 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MitoXpress Xtra (MitoXpress Xtra Reagent Pack; Agilent), a fluorescent molecule that allows real-time measurement of dissolved oxygen concentrations, was added. Finally, 100 μL of mineral oil (MitoXpress Xtra Reagent Pack; Agilent) was added to seal the wells and isolate the reaction medium from ambient air oxygen.

Measurement of Oxygen Consumption

Oxygen concentrations were measured in real time for 90 min at 28°C using a spectrofluorometer (Tecan Spark: $\lambda_{\text{excitation}}$ 380 nm, $\lambda_{\text{emission}}$ 650 nm). According to Agilent, other spectrofluorometers can be used with the MitoXpress Xtra assay. Results are expressed in percentage of O_2 consumed, which were calculated as follows:

$$\text{O}_2 \text{ consumption (\%)} = 100 \times \frac{\text{AUC}_{\text{product}} - \text{AUC}_{\text{blank}}}{\text{AUC}_{\text{control}} - \text{AUC}_{\text{blank}}},$$

where AUC is area under curve during exponential increase of O_2 consumption.

Résultats (non publiés)

La méthode ayant été testée et vérifiée, nous avons voulu caractériser la respiration dans les larves de notre modèle d'intoxication au DFP. Pour cela, les larves ont été exposées au DFP pendant 4,5 heures, puis la sonde a été ajoutée dans le milieu que nous isolons de l'air ambiant par l'ajout d'huile minérale. La lecture de la fluorescence se fait ensuite pendant 1,5 heure, amenant le temps d'exposition total au DFP à 6 h à la fin de l'expérience. Les données de cette expérience nous ont permis de tracer des courbes de l'intensité de fluorescence au cours du temps, qui est proportionnelle à la consommation de dioxygène (**Figure 18A**). Ces courbes finissent par atteindre un plateau qui indique que le milieu est dépourvu de dioxygène (O_2). La consommation d' O_2 s'analysant sur la portion linéaire, on s'intéresse aux 20-30 premières minutes de l'enregistrement (**Figure 18B**). Contrairement à ce qui est décrit dans l'article, nous analysons ici la pente de la portion linéaire des courbes obtenues et non l'aire sous la courbe. Pour cela, nous effectuons une régression linéaire et nous nous intéressons au coefficient directeur obtenu. Après normalisation par rapport aux valeurs obtenues pour la condition contrôle « DMSO », nous obtenons la vitesse relative de consommation d' O_2 de nos larves exposées au DFP. Ainsi, les résultats suggèrent que ces dernières « respirent » moins bien que les larves contrôles. En effet, leur vitesse relative de consommation d' O_2 est de $78 \pm 2\%$ par rapport à celle des contrôles (**Figure 18C**), indiquant donc un défaut de consommation d' O_2 chez nos larves exposées au DFP, défaut qu'on retrouve également chez l'Homme.

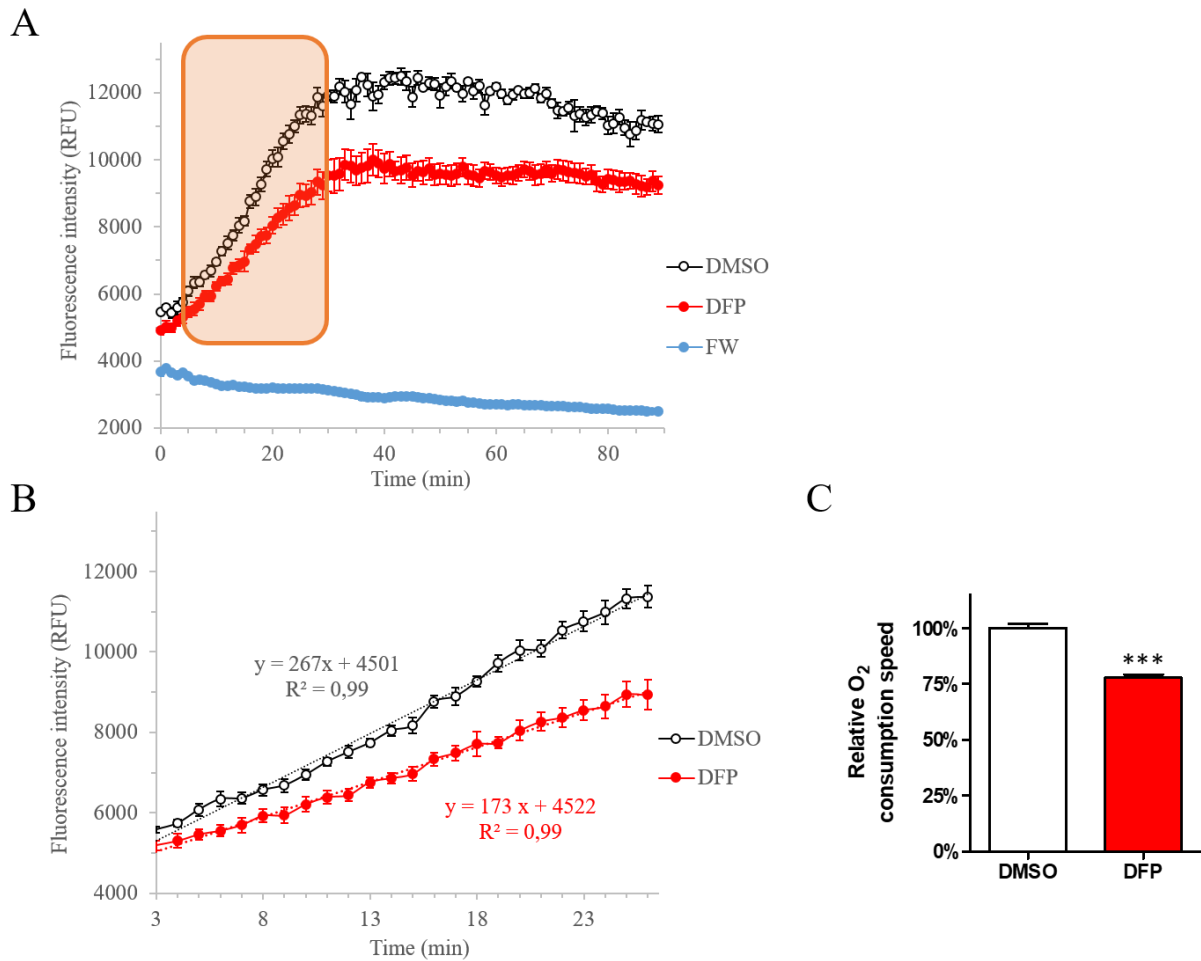


Figure 18 : consommation d'O₂ altérée des larves exposées au DFP

(A) Courbes d'intensité de fluorescence au cours du temps de larves exposées au DMSO 1% ou au DFP 15 μ M. La partie encadrée en orange correspond à la portion linéaire de la courbe sur laquelle la régression linéaire a été effectuée (B) Régression linéaire de la portion linéaire des courbes d'intensité de fluorescence, qui se situe entre 0-3 minutes et 20-30 minutes. Les équations des droites issues de la régression sont sous la forme $y = ax + b$, où a est le coefficient directeur (pente) auquel on s'intéresse. (C) Vitesse relative en pourcentage de la consommation d'O₂ par les larves exposées au DMSO (n=27 puits, N=5 expériences) ou au DFP (n=43, N=5). Les barres d'erreurs représentent la SEM et le test statistique utilisé est un test non paramétrique de Mann-Whitney (ici, *** : $p < 0,0001$).

Discussion et perspectives

Dans un premier temps, ce travail a permis de mettre au point une nouvelle technique de mesure de consommation d'O₂ par des larves de poisson zèbre moins onéreuse que celles déjà existantes. Les défauts de respiration, qu'il s'agisse des échanges gazeux avec le milieu ou de la respiration mitochondriale, peuvent être révélateurs ou causes de pathologies. La caractérisation de ces défauts peut donc être utile pour l'obtention d'informations sur l'état

physiologique de l'organisme vivant étudié. Cette méthode rend ainsi l'étude de ce paramètre plus accessible.

Dans un second temps, l'application de cette technique à notre modèle, qui peut être catégorisé comme appartenant au grade de sévérité d'empoisonnement de niveau 1 d'après les critères morphologiques et comportementaux de Faria et al. (2015) (diminution modérée de la locomotion et peu voire pas de défauts morphologiques), a permis de caractériser davantage les défauts induits par l'intoxication aiguë au DFP. Il apparaît alors que cette intoxication aiguë engendre des défauts de consommation d'O₂ chez les larves. Cependant, il a été montré dans l'article décrivant le modèle (Chapitre 3, partie I) que les larves exposées au DFP étaient moins mobiles que les larves contrôles. La baisse de consommation d'O₂ pourrait donc être liée à cette baisse d'activité locomotrice. Pour vérifier si les larves consomment moins d'O₂ pour cette raison, il faudrait refaire des expériences en incluant un groupe de larves exposé à un anesthésiant comme la tricaine méthanesulfonate ou l'eugéno/iso-eugéno, qui permettent de sédaté les larves, et un autre groupe exposé à un paralysant comme le bromure de pancuronium.

En outre, il serait également intéressant d'étudier la respiration mitochondriale et plus particulièrement l'impact du DFP sur les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, le dysfonctionnement de la mitochondrie, qui est souvent appelée « centrale énergétique de la cellule », peut avoir de nombreuses répercussions. Il serait donc intéressant d'étudier la mitochondrie dans ce contexte afin de mieux caractériser les effets du DFP. Il a d'ailleurs déjà été montré que certains OP pouvaient perturber la fonction mitochondriale, notamment en provoquant un stress oxydatif (Farkhondeh et al. 2020; Leung and Meyer 2019). Cette étude pourrait être faite à l'aide du SeaHorse XFe24, qui a déjà été utilisé pour des études sur le poisson zèbre (Bond et al. 2018; Souders et al. 2018).

Chapitre 4 : **Étude de la microglie**

INTRODUCTION

Les organophosphorés sont des composés largement utilisés dans les pesticides et comme agents neurotoxiques de guerre. Ils agissent en inhibant l'acétylcholinestérase, une enzyme chargée d'hydrolyser l'acétylcholine, un neurotransmetteur, afin de terminer la transmission d'un signal nerveux. Cependant, de nombreuses observations suggèrent que d'autres mécanismes contribuent à la neurotoxicité de ces composés. En particulier, il existe de nombreuses preuves expérimentales qui indiquent que l'intoxication aiguë aux OP provoque une réponse inflammatoire accrue et robuste (Banks and Lein 2012). Dans le système nerveux central, cette réponse est principalement due à la microglie (Maupu et al. 2021). Nous nous sommes donc intéressés à ce type cellulaire. En particulier, nous avons voulu caractériser la réponse microgliale par ses changements morphologiques d'une part, et d'autre part, par sa réponse inflammatoire. Par la suite, nous nous sommes demandé si la microglie avait plutôt un rôle neurotoxique ou neuroprotecteur. Pour cela, nous avons réalisé l'ablation de la microglie, puis nous avons étudié les conséquences de cette ablation sur le profil inflammatoire et sur l'hyperactivité neuronale observée après exposition au DFP.

RÉSULTATS

Les cellules microgliales changent de morphologie après exposition au DFP

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une exposition au DFP pendant 6 heures sur le phénotype microglial. Pour cela, nous avons imagé *in vivo* le cerveau de larves de 5 jpf après 6 heures de traitement au DFP 15 μ M ou au DMSO 1% (contrôle). Nous avons remarqué que la microglie dans les larves contrôles est bien plus ramifiée que la microglie dans les larves traitées au DFP, qui est plus ronde et qui prend une forme dite amiboïde (**Figure 19B – 19C**). À l'aide d'Imaris, un logiciel permettant l'analyse d'images 3D, nous avons quantifié ces changements morphologiques en nous intéressant à plusieurs paramètres comme la sphéricité, l'aire surfacique et le volume des cellules microgliales, mais aussi le nombre moyen de prolongements, la longueur totale et la longueur moyenne de ces prolongements (**Figure 19D – 19I**). En accord avec nos observations, la quantification de ces paramètres a permis de déterminer que les cellules microgliales étaient effectivement plus sphériques après exposition au DFP (**Figure 19D**), passant d'un coefficient Ψ de $0,63 \pm 0,01$ ($N = 13$ larves, $n = 327$ cellules microgliales) pour les contrôles, à $0,79 \pm 0,01$

pour les larves traitées (N = 14 larves, n = 294 cellules microgliales ; $p < 0,0001$). L'exposition au DFP n'a pas eu d'incidence sur le volume moyen des cellules microgliales ($1724 \pm 58 \mu\text{m}^3$ pour les contrôles vs $1654 \pm 56 \mu\text{m}^3$ pour les larves traitées ; $p = 0,64$; **Figure 19F**), contrairement à l'aire surfacique qui est diminuée (**Figure 19E**), passant de $1118 \pm 27 \mu\text{m}^2$ pour les contrôles à $840 \pm 20 \mu\text{m}^2$ pour les traitées ($p < 0,0001$). Ce changement de répartition du volume peut s'expliquer par une diminution du nombre de prolongements (4,5 en moyenne contre 1 pour les traitées, $p < 0,0001$, **Figure 19G**), dont le volume serait « rapatrié » dans le corps cellulaire. De plus, les cellules microgliales contrôles ayant davantage de prolongements, ces derniers ont, logiquement, une longueur totale plus importante ($80,9 \pm 2,1 \mu\text{m}$ vs $12,1 \pm 1,3 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$; **Figure 19H**). En revanche, si on rapporte la longueur totale des prolongements au nombre de prolongements, on se rend compte qu'en moyenne, un prolongement d'une microglie exposée au DFP est $4 \mu\text{m}$ plus court que celui d'une microglie contrôle (**Figure 19I**). Ces résultats sont complétés par l'analyse en clusters que nous avons réalisée pour étudier la répartition de la population microgliale. Ainsi, le cluster représentant les cellules microgliales de larves contrôles (**Figure 19J**) montre 3 types de populations. Une première population, qui est majoritaire, représente les cellules microgliales ramifiées (47%), catégorie correspondant à des cellules microgliales ayant un corps cellulaire relativement de petite taille et de nombreux prolongements ramifiés. Une deuxième représente les cellules amiboïdes, qui sont en petite proportion (15%) et qui correspond à des cellules microgliales avec un corps cellulaire relativement volumineux et peu de prolongements, qui sont également peu ramifiés. Enfin, on distingue une dernière population avec des caractéristiques intermédiaires, une population dite « transitionnelle » (38%). Cette même analyse est réalisée à partir des paramètres morphologiques des cellules microgliales issues de larves traitées au DFP (**Figure 19K**) et montre une modification importante de la répartition générale de la population microgliale, avec une disparition quasi-totale de la population ramifiée (2%) en faveur de la population amiboïde, qui passe ainsi de 15% à 73%, avec toujours une part de cellules microgliales « transitionnelles » (25%).

Une autre façon de montrer ces changements morphologiques consiste à réaliser une analyse de Sholl. Cette analyse compte le nombre d'intersections entre les prolongements de la cellule et des sphères fictives de différents rayons, dont le centre correspond au corps cellulaire. Elle permet de se rendre compte de l'étalement spatial des cellules étudiées. On peut ainsi remarquer que les cellules microgliales de larves exposées au DFP ont effectivement moins de prolongements et que ces prolongements sont également plus courts (**Figure 19L**).

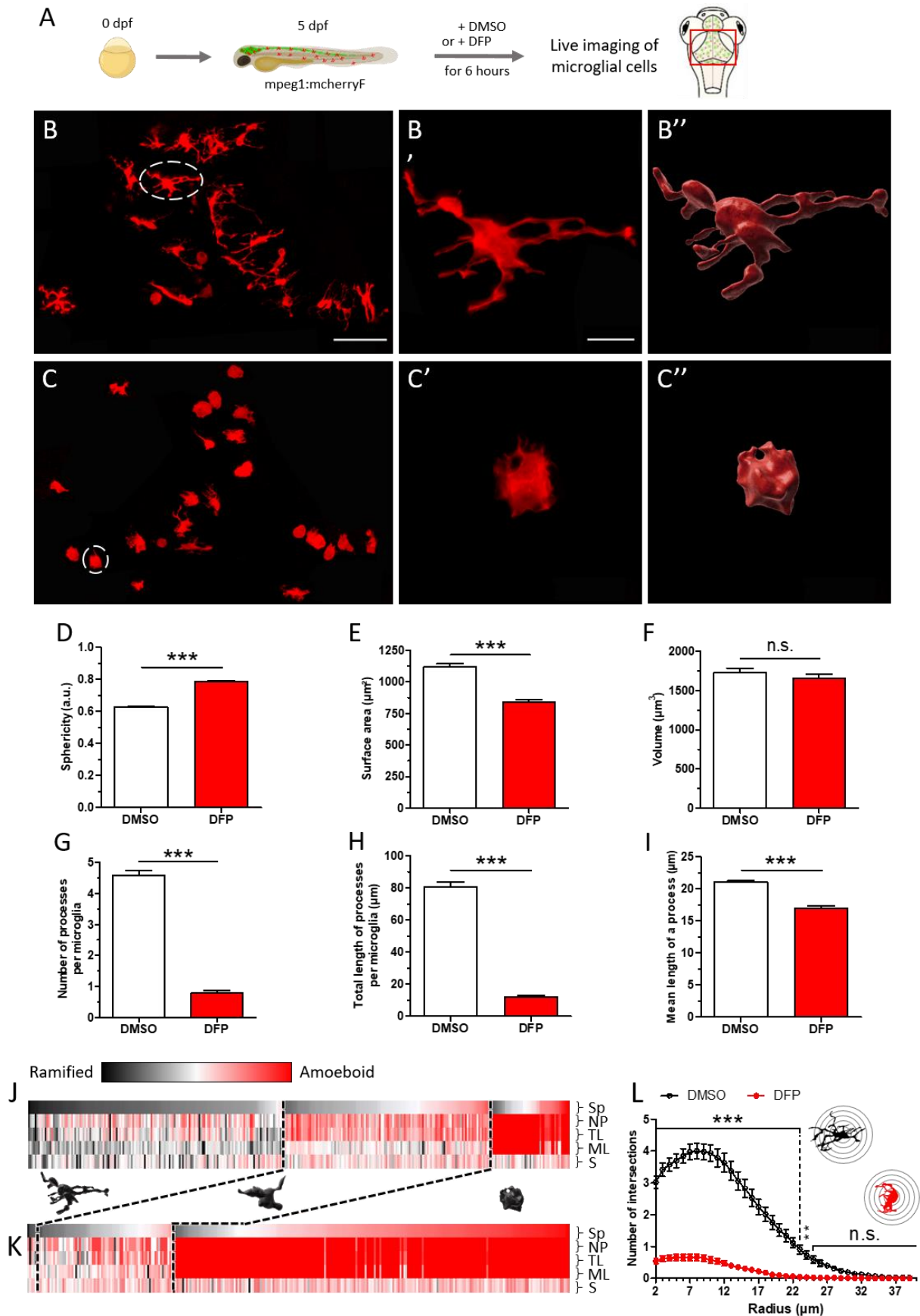


Figure 19 : changements morphologiques de la microglie après exposition au DFP

(A) Schéma du protocole expérimental : des larves de 5 jpf de la lignée *mpeg1:mCherryF* sont exposées soit au DMSO 1% (contrôle), soit au DFP 15 μM pendant 6 heures, puis sont imagées vivantes. La région d'intérêt, encadrée en rouge, correspond au tectum optique. (B–C) Cellules microgliales d'une larve contrôle (B) et d'une larve traitée au DFP (C). (B', B'') Gros plan de la cellule microgliale entourée en pointillés blancs dans la larve contrôle (B') et sa reconstruction 3D (B''). (C', C'') Gros plan de la cellule microgliale entourée en pointillés blancs dans la larve traitée au DFP (C') et sa reconstruction 3D (C''). (D–I) Quantification de la sphéricité (D), de l'aire surfacique (E), du volume (F), du nombre de prolongements moyen des cellules microgliales (G), de la longueur totale des prolongements par microglie (H), et de la longueur moyenne d'un prolongement (I) pour les cellules microgliales des larves exposées au DMSO ou au DFP. (J–K) Étude de la répartition de la population microgliale dans des larves exposées au DMSO (J) et au DFP (K). Les clusters sont réalisés à partir des données sur la sphéricité (SP), le nombre moyen de prolongements (NP), la longueur totale des prolongements (TL), la longueur moyenne de chaque prolongement (ML) et l'aire surfacique (S). Chaque colonne représente une microglie et chaque paramètre est codé par une couleur allant du noir, correspondant à une microglie ramifiée, au rouge, correspondant à une microglie amiboïde. Les pointillés noirs séparent les différents types de populations observées (ramifiée, « transitionnelle » et amiboïde). (L) L'analyse de Sholl montre de nouveau les différences morphologiques entre les cellules microgliales des larves exposées au DMSO et celles des larves exposées au DFP : les cellules microgliales contrôles ont des prolongements plus nombreux et plus longs que les cellules microgliales traitées au DFP. Échelles : (B, C) = 50 μm , (B', B'', C', C'') = 10 μm . Tous les graphes représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent à la SEM (erreur standard à la moyenne). Les *p-values* ont été calculées en utilisant un test non paramétrique de Mann-Whitney. n.s., non significatif ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

L'ensemble de ces résultats montre qu'il y a un changement drastique de la morphologie des cellules microgliales après exposition au DFP, suggérant fortement une activation de type pro-inflammatoire de ces cellules

Les cellules microgliales sont plus mobiles après exposition au DFP

Nous nous sommes ensuite intéressés à la mobilité des cellules microgliales. En effet, en observant ces cellules, il nous semblait que ces dernières se mouvaient davantage après exposition au DFP (**Figure 20G, 20H**). Nous avons donc exposé des larves *mpeg1:mCherryF* de 5 jpf au DMSO 1% (contrôle) ou au DFP 15 μM , puis nous avons imagé les cellules microgliales de larves pendant les 30-45 dernières minutes du traitement (entre la 5^{ème} et la 6^{ème} heure de traitement), toujours en présence de DMSO 1% ou de DFP 15 μM . Nous avons ensuite retracé le parcours effectué par le corps cellulaire des cellules microgliales. La **Figure 20B** représente ainsi le parcours réalisé par les cellules microgliales dans le cerveau d'une larve

contrôle, et la **Figure 20C**, celui dans le cerveau d'une larve exposée au DFP. À la vue des tracés, il nous semble déjà voir une tendance vers l'augmentation de la mobilité des cellules. Nous avons ensuite quantifié la longueur de ces parcours (**Figure 20D**). En moyenne, le corps cellulaire des cellules microgliales des cerveaux de larves traitées au DFP (N = 5 larves, n = 48 cellules microgliales) parcourent presque 1 μm de plus ($p = 0,0004$) par minute que des larves contrôles (N = 6 larves, n = 50 cellules microgliales).

L'exposition au DFP induit une inflammation importante

Les cellules microgliales amiboïdes sont généralement accompagnées d'inflammation (Devinsky et al. 2013; Giulian 1987), c'est pourquoi nous avons voulu étudier le profil inflammatoire au cours de l'exposition au DFP dans les larves entières. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'expression de 2 cytokines pro-inflammatoires, l'*il-1 β* et l'*il-8*, et de 2 cytokines anti-inflammatoires, l'*il-4* et le *tgf- β 3*, dont l'abondance des transcrits a été rapportée à celle du gène *tbp* (McCurley and Callard 2008). Les niveaux d'expression de ces gènes ont été étudiés par RT-qPCR et le profil d'expression a été étudié entre 0 h et 6 h d'exposition au DFP 15 μM ou au DMSO 1%. Nous avons observé, en accord avec notre hypothèse, que la plupart des gènes étudiés était effectivement surexprimée de façon importante après exposition au DFP, et ce, dès 2 heures d'exposition au DFP (**Figure 21**). Les cytokines pro-inflammatoires sont celles ayant montré la surexpression la plus importante après 6 heures d'exposition, en particulier l'*il-1 β* , qui était 413 ± 67 fois plus exprimée dans les larves exposées au DFP que dans celles exposées au DMSO ($p < 0,0001$) et qui montrait déjà une forte surexpression après seulement 2 h d'exposition ($10,5 \pm 2,4$). L'*il-8* était également surexprimé, bien que de façon plus modérée que l'*il-1 β* . En effet, sa surexpression est déjà significative au bout d'une heure, mais avec un niveau d'expression de seulement $1,6 \pm 0,2$ celui du contrôle ($p = 0,02$). Elle augmente un peu plus fortement après 2 heures d'exposition au DFP, montant à $3,3 \pm 0,7$, puis de façon un peu plus prononcée après 4 h (26 ± 9), pour finalement atteindre environ 45 fois le niveau du contrôle au bout de 6 heures d'exposition. Les données obtenues sur les cytokines pro-inflammatoires confirment une forte inflammation globale dès 2 heures après exposition au DFP. Quant aux cytokines anti-inflammatoires, l'*il-4* était également significativement surexprimé mais de façon beaucoup moins prononcée que les cytokines pro-inflammatoires, avec un niveau d'environ 5 fois celui du contrôle ($p < 0,0001$) après 5 h de traitement au DFP et 3 fois ($p = 0,0002$) après 6 h. Enfin, le *tgf- β 3* ne semblait pas surexprimé. Son expression

reste stable tout au long de l'exposition au DFP et il est exprimé seulement $1,1 \pm 0,1$ fois plus que dans le contrôle après 6 h de traitement ($p = 0,89$).

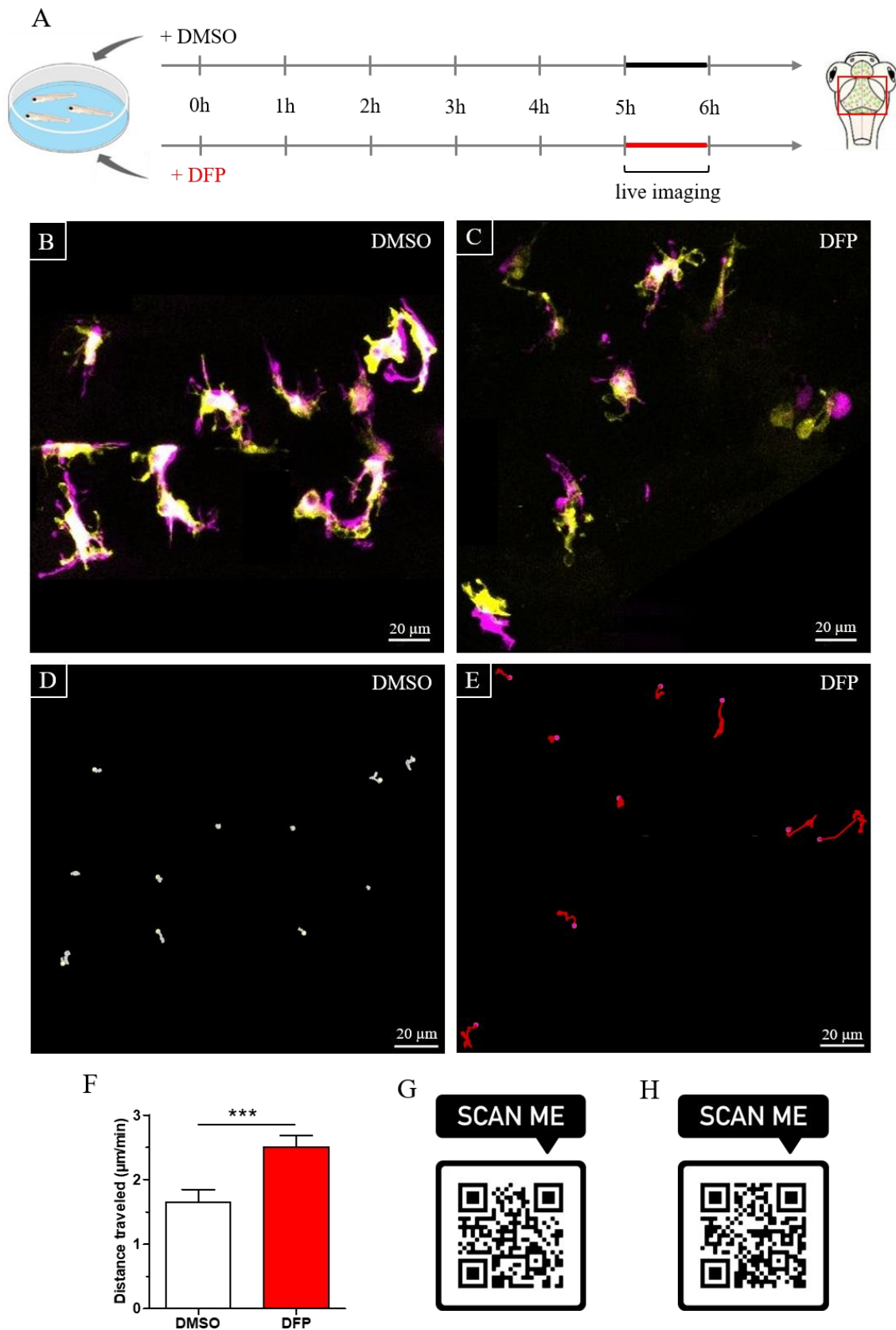


Figure 20 : les cellules microgliales sont davantage mobiles après exposition au DFP

(A) Schéma du protocole expérimental : des larves de 5 jpf de la lignée *mpeg1:mCherryF* sont exposées soit au DMSO 1% (contrôle), soit au DFP 15 μM pendant 6 heures, puis sont imagées vivantes pendant la dernière heure de traitement. La région d'intérêt, encadrée en rouge, correspond au tectum optique. (B–C) Images superposées de 2 temps (0' : jaune ; 60' : magenta) montrant le déplacement des cellules microgliales au cours de l'enregistrement lorsque les larves sont exposées au DMSO (B) ou au DFP (C). Le blanc représente la superposition du jaune et du magenta. Le chemin parcouru par le corps cellulaire des cellules microgliales des larves exposées au DMSO (D) ou au DFP (E) est ensuite retracé. Les petites sphères correspondent à l'emplacement des corps cellulaires au début des enregistrements. (F) Quantification de la distance parcourue par minute par le corps cellulaire des cellules microgliales (DMSO : n = 50 cellules microgliales, N = 6 larves ; DFP : n = 48 cellules microgliales, N = 5 larves). (G) QR code d'une vidéo montrant les cellules microgliales et leur corps cellulaire peu mobile d'une larve de 5 dpf exposée au DMSO 1% pendant 6 h (la vidéo montre les 45 dernières minutes du traitement). La vidéo est aussi disponible à l'adresse suivante : https://youtu.be/7fuTJj4u_IA (H) QR code d'une vidéo montrant les cellules microgliales d'une larve de 5 dpf exposée au DFP 15 μM pendant 6 h (la vidéo montre les 45 dernières minutes du traitement). Les corps cellulaires des cellules microgliales semblent plus mobiles que ceux des larves contrôles. La vidéo est aussi disponible à l'adresse suivante : https://youtu.be/tVIytzIbI_Q. Le graphe représente la moyenne et les barres d'erreurs correspondent à la SEM (erreur standard à la moyenne). La *p*-value a été calculée en utilisant un test non paramétrique de Mann-Whitney. n.s., non significatif ; *** $p < 0,001$

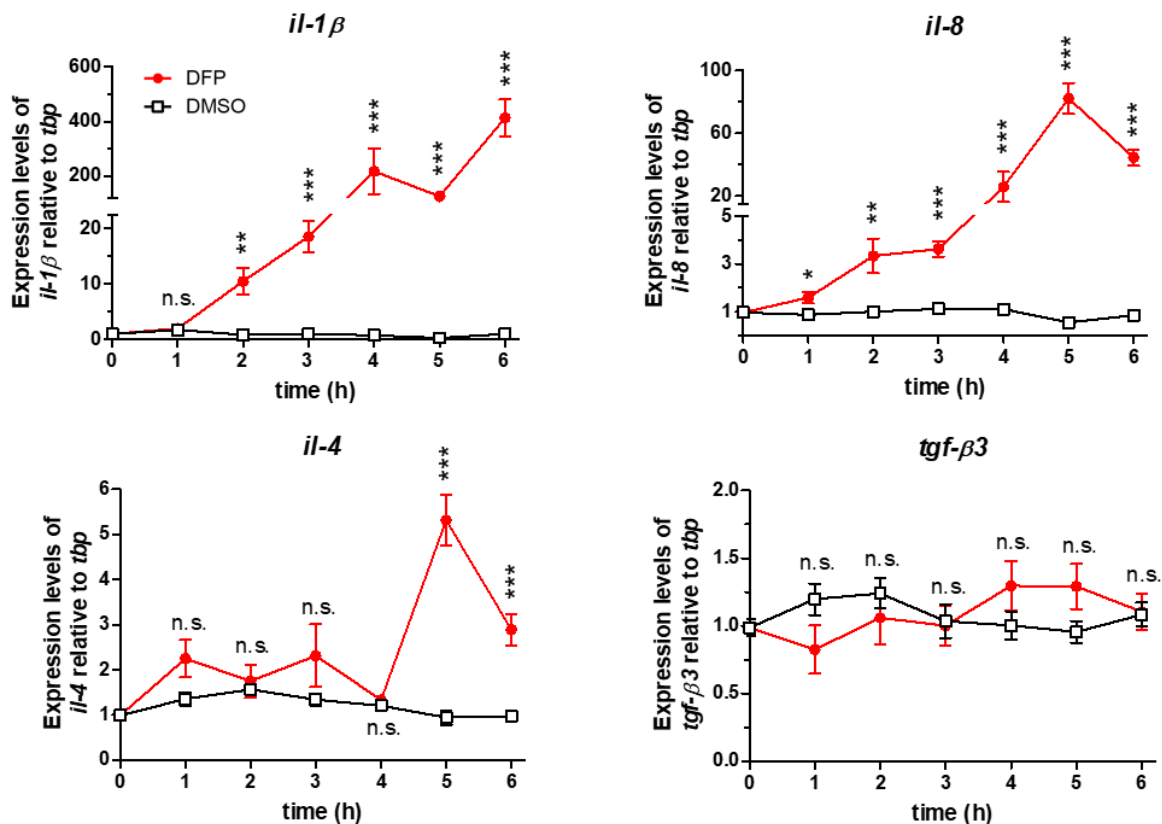


Figure 21 : profil inflammatoire dans les larves entières au cours du temps après exposition au DMSO ou au DFP

Les graphes représentent l'évolution des niveaux relatifs d'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées (*il-1 β* et *il-8* ; *il-4* et *tgf- β 3*). Les niveaux d'expression sont rapportés aux niveaux d'expression de *tbp*, puis normalisés par rapport au contrôle (larves exposées au DMSO). Tous les graphes représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent à la SEM (erreur standard à la moyenne). Les *p-values* ont été calculées en utilisant un *t*-test de Student avec ou sans la correction de Welch quand les données suivaient une loi de distribution normale, et un test non paramétrique de Mann-Whitney quand cela n'était pas le cas. n.s., non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que suite à l'exposition au DFP, la balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires est largement en faveur des cytokines pro-inflammatoires, confirmant que le DFP provoque une activation pro-inflammatoire des cellules microgliales, suggérant ainsi un potentiel rôle neurotoxique de la microglie.

RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES

Neuroinflammation

L'étude du profil inflammatoire précédemment discutée a montré une forte augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires étudiées au niveau des larves entières. Le DFP ayant des conséquences au niveau neurologique, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la neuroinflammation afin d'avoir une idée de la part de la neuroinflammation dans l'inflammation observée. Pour cela, nous avons réalisé des RT-qPCR sur des cerveaux de larves disséqués (10 cerveaux disséqués par échantillon, N = 4-5 échantillons, [Figure 22](#)). Nous avons pu observer une nouvelle fois une très forte surexpression de l'*il-1 β* et de l'*il-8*. Ainsi, nous avons trouvé que le niveau d'expression de l'*il-1 β* était 190 ± 37 fois supérieur à celui du contrôle après exposition au DFP ($p = 0,0079$), et celui de l'*il-8* l'était de 22 ± 5 fois ($p = 0,0159$). Les cytokines anti-inflammatoires, en revanche, sont toujours peu voire pas surexprimées. Seul le niveau d'expression de l'*il-4* est légèrement augmenté de $2,9 \pm 0,8$ après exposition au DFP ($p = 0,06$). Enfin, le niveau d'expression de *tgf- β 3* était stable à $0,6 \pm 0,2$ ($p = 0,20$).

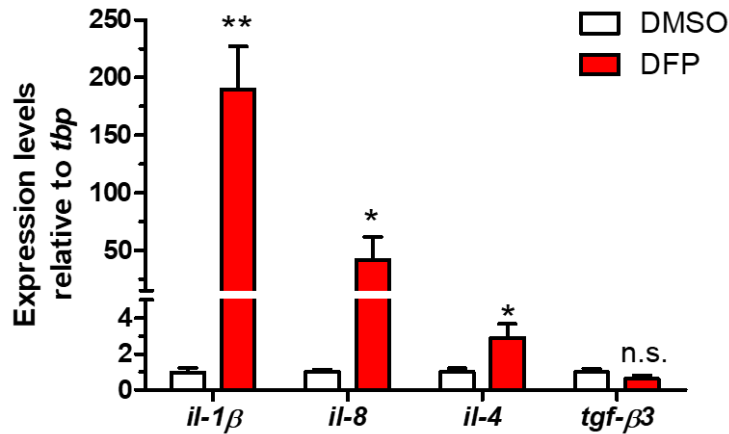


Figure 22 : profil neuroinflammatoire des larves exposées au DMSO ou au DFP

Le graphe représente les niveaux relatifs d'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées (*il-1β* et *il-8* ; *il-4* et *tgf-β3*) dans le cerveau des larves. Les niveaux d'expression sont rapportés aux niveaux d'expression de *tbp*, puis normalisés par rapport au contrôle (cerveaux de larves exposées au DMSO). Tous les graphes représentent la moyenne et les barres d'erreurs correspondent à la SEM (erreur standard à la moyenne). Les *p-values* ont été calculées en utilisant un *t*-test de Student avec ou sans la correction de Welch quand les données suivaient une loi de distribution normale, et un test non paramétrique de Mann-Whitney quand cela n'était pas le cas. n.s., non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Ces données confirment la présence d'une neuroinflammation importante dans le cerveau des larves traitées au DFP, caractérisée par une surexpression significative des cytokines pro-inflammatoires, mais pas des cytokines anti-inflammatoires.

Conséquences de l'ablation de la microglie sur le profil inflammatoire

L'expression massive de cytokines pro-inflammatoires suggère un potentiel rôle néfaste de la microglie. En effet, l'inflammation est impliquée dans l'aggravation des crises épileptiques, caractérisées par une surexcitation des neurones cérébraux. Nous avons donc cherché à savoir si, en l'absence de microglie, les larves exposées au DFP surexprimaient toujours autant les cytokines pro-inflammatoires et si l'activité calcique neuronale était modifiée. Pour cela, nous avons injecté les embryons de poisson zèbre au stade une cellule avec un morpholino-oligonucléotique inhibant la traduction des ARN *pu.1*, comme détaillé dans la section "ABLATION DE LA MICROGLIE PAR MICROINJECTION DE MORPHOLINO" du chapitre "Matériel et méthodes". À 1 jpf, la qualité de l'injection est vérifiée par fluorescence grâce au témoin d'injection, la rhodamine. Seuls les embryons avec une fluorescence bien diffuse dans tout le corps sont gardés. À 4 jpf, on vérifie à nouveau par fluorescence qu'il n'y a pas de

marquage mCherryF dans le cerveau afin de s'assurer de l'absence de microglie. On effectue ensuite le traitement au DMSO 1% ou au DFP 15 μ M à 5 jpf.

Par la suite, on notera « DMSO » et « DFP » les conditions où les larves ont un développement microglial normal et ont été traitées respectivement au DMSO ou au DFP, et « MO PU.1 DMSO » et « MO PU.1 DFP » les conditions où les larves sont dépourvues de microglie (injectées avec le MO PU.1) et sont exposées respectivement au DMSO ou au DFP.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés au profil inflammatoire des larves dépourvues de microglie qui ont été exposées au DFP (**Figure 23**). Nous avons observé qu'il y avait toujours une surexpression de l'*il-1 β* (MO PU.1 DMSO : $1,2 \pm 0,2$ / MO PU.1 DFP : $134,0 \pm 44,3$; n=7-8 ; * p = 0,02) et de l'*il-8* (MO PU.1 DMSO : $1,1 \pm 0,1$ / MO PU.1 DFP : $15,7 \pm 4,7$; n=7-8 ; * p = 0,02). Bien que ces cytokines soient surexprimées après exposition au DFP malgré l'absence de microglie, il est à noter que cette surexpression est significativement moindre par rapport aux larves pourvues de cellules microgliales exposées au DFP (**Tableau 4** et **Tableau 5**). La diminution d'expression des cytokines *il-1 β* et *il-8* entre ces deux conditions s'explique donc par l'absence de la microglie, qui est un acteur majeur de la sécrétion des cytokines. Quant à l'inflammation résiduelle observée, elle est très certainement due à de l'inflammation périphérique et aux astrocytes et aux neurones qui sont aussi capables de sécréter des cytokines. En ce qui concerne les cytokines anti-inflammatoires, on remarque une baisse de l'expression de l'*il-4*, qui passe de $2,23 \pm 0,43$ en condition « DFP », à $1,20 \pm 0,20$ en condition « MO PU.1 DFP », regagnant ainsi le niveau d'expression observé dans les larves « MO PU.1 DMSO » (p = 0,91) et « DMSO » (p = 0,81). Ce résultat suggère que la microglie est le type cellulaire principal exprimant ce gène dans notre modèle. Pour le *tgf- β 3*, le niveau d'expression reste stable, quelles que soient les conditions. Ces résultats sur le profil inflammatoire suggèrent que la microglie a une part très importante dans la réponse inflammatoire qui suit l'exposition des larves au DFP. En effet, en l'absence de microglie, le niveau d'expression après exposition au DFP de l'*il-1 β* diminue de 72%, celui de l'*il-8* de 69%, et celui de l'*il-4* de 46%. Celui de *tgf- β 3* restant stable peu importe la condition, on suppose que la microglie n'exprime pas, ou très peu, cette cytokine dans notre modèle.

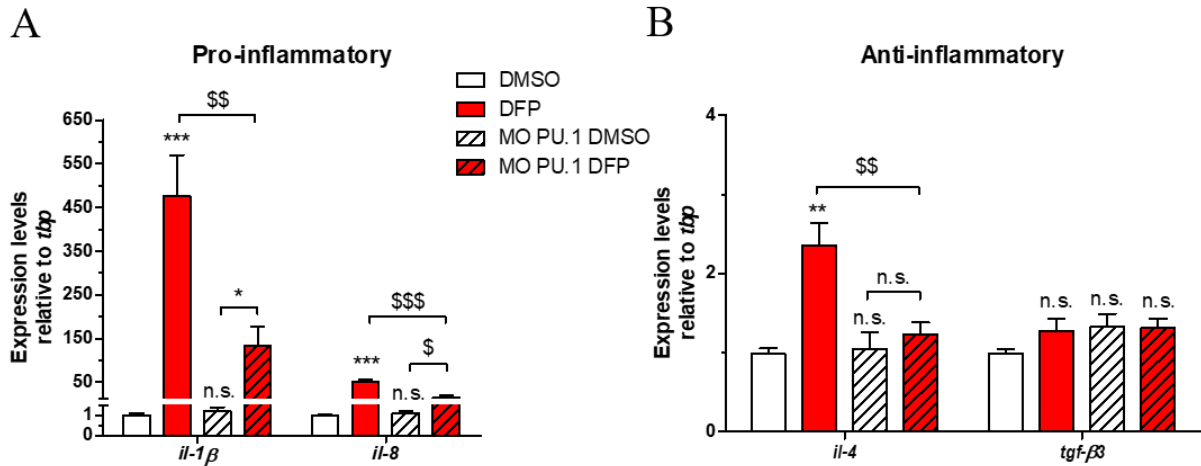


Figure 23 : profil inflammatoire de larves avec ou dépourvues de cellules microgliales après exposition au DMSO ou au DFP

Niveaux relatifs d'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées (*il-1β* et *il-8* ; *il-4* et *tgf-β3*) dans des larves entières avec ou dépourvues de microglie et après exposition au DMSO ou au DFP pendant 6 h. Les * ou n.s. indiquent au-dessus des colonnes correspondent à des comparaisons faites avec la condition « DMSO » du gène étudié. Sinon, le symbole \$ est utilisé au-dessus d'un crochet dont les extrémités indiquent les conditions comparées. Test statistique utilisé : ANOVA à 2 voies. * ou \$: $p < 0,05$; ** ou \$\$: $p < 0,01$; *** ou \$\$\$: $p < 0,001$. n.s. : non significatif

<i>il-1β</i>	With microglia	Without microglia (MO PU.1)	Statistical difference
DMSO	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	n.s. p = 0.255
DFP	475.6 ± 94.4	134.0 ± 44.3	** p = 0.006
Statistical difference	** p = 0.002	* p = 0.020	(a) * p = 0.020

Tableau 4 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression de l'*il-1β*

Valeurs des niveaux relatifs d'expression de l'*il-1β*. Les niveaux d'expression l'*il-1β* sont rapportés aux niveaux d'expression de *tbp*, puis normalisés par rapport au contrôle (larves avec microglie exposées au DMSO). ^(a) Correspond à la différence statistique entre les conditions « DMSO » et « MO PU.1 DFP ». n.s. : non significatif

<i>il-8</i>	With microglia	Without microglia (MO PU.1)	Statistical difference
DMSO	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	n.s. p = 0.296
DFP	51.4 ± 6.1	15.7 ± 4.7	*** p = 0.0004
Statistical difference	*** p = 0.0002	* p = 0.017	(a) * p = 0.016

Tableau 5 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression de l'*il-8*

Valeurs des niveaux relatifs d'expression de l'*il-8*. Les niveaux d'expression l'*il-8* sont rapportés aux niveaux d'expression de *tbp*, puis normalisés par rapport au contrôle (larves avec microglie exposées au DMSO). ^(a) Correspond à la différence statistique entre les conditions « DMSO » et « MO PU.1 DFP ». n.s. : non significatif

<i>il-4</i>	With microglia	Without microglia (MO PU.1)	Statistical difference
DMSO	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	n.s. p = 0.793
DFP	2.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2	** p = 0.003
Statistical difference	** p = 0.002	n.s. p = 0.493	(a) n.s. p = 0.171

Tableau 6 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression de l'*il-4*

Valeurs des niveaux relatifs d'expression de l'*il-4*. Les niveaux d'expression l'*il-4* sont rapportés aux niveaux d'expression de *tbp*, puis normalisés par rapport au contrôle (larves avec microglie exposées au DMSO). ^(a) Correspond à la différence statistique entre les conditions « DMSO » et « MO PU.1 DFP ». n.s. : non significatif

<i>tgf-β3</i>	With microglia	Without microglia (MO PU.1)	Statistical difference
DMSO	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	n.s. p = 0.094
DFP	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	n.s. p = 0.834
Statistical difference	n.s. p = 0.139	n.s. p = 0.957	(a) * p = 0.036

Tableau 7 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression du *tgf-β3*

Valeurs des niveaux relatifs d'expression du *tgf-β3*. Les niveaux d'expression du *tgf-β3* sont rapportés aux niveaux d'expression de *tbp*, puis normalisés par rapport au contrôle (larves avec microglie exposées au DMSO). ^(a) Correspond à la différence statistique entre les conditions « DMSO » et « MO PU.1 DFP ». n.s. : non significatif

Conséquences de l'ablation de la microglie sur l'activité neuronale

De nombreux résultats suggèrent que les cytokines pro-inflammatoires modulent l'excitabilité du cerveau, augmentant sa susceptibilité à générer des crises d'épilepsie (Galic, Riazi, and Pittman 2012). Nous nous sommes donc demandé si la diminution d'expression de l'*il-1 β* et de l'*il-8*, d'environ 70% celle des contrôles observée précédemment, avait une incidence sur l'activité neuronale. Nous avons donc étudié cette dernière de 2 façons différentes : la première en regardant l'expression du gène précoce-immédiat (*Immediate Early Gene*, IEG, en anglais) *fosab*, l'orthologue du *c-Fos* des mammifères dans le poisson zèbre, par RT-qPCR ; la deuxième en enregistrant l'activité calcique neuronale par imagerie *in vivo*.

c-Fos est un gène qui est exprimé par les neurones dans les minutes suivant un stress (de Medeiros, Reis, and Mello 2005; Senba et al. 1993), et en particulier à la suite d'une stimulation synaptique (Bullitt 1990; Hudson 2018). Son expression est souvent utilisée comme un marqueur moléculaire de l'activité neuronale (Bullitt 1990; Chung 2015). Nous avons donc étudié son expression dans les larves de poisson zèbre dans les 4 conditions précédemment définies (**Figure 24A**). Comme déjà observé précédemment (Chapitre 3), l'expression de *fosab* est fortement augmentée après exposition au DFP ($22,2 \pm 2,9$ fois le niveau des contrôles, $p < 0,0001$). De façon intéressante, en l'absence de microglie, la surexpression de *fosab* après exposition au DFP est partiellement mais significativement réduite, passant à $7,3 \pm 1,5$ fois le contrôle ($p < 0,0001$ en comparaison avec la condition « DFP »). Cette réduction d'expression suggère une diminution de l'activité neuronale qui pourrait être, selon notre hypothèse, due à une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité calcique neuronale des larves dépourvues de cellules microgliales et exposées au DFP. En effet, suite à un potentiel d'action, la dépolarisation d'une terminaison synaptique provoque l'ouverture de canaux ioniques perméables au calcium, provoquant alors un influx intracellulaire d'ions calciques. Il a ainsi été montré que l'activité électrique des neurones était corrélée à leur activité calcique (Brenet et al. 2019; Liu and Baraban 2019). Nous avons donc enregistré l'activité calcique neuronale des embryons pendant environ 1 h (**Figure 24B–D**). L'activité calcique neuronale après exposition au DFP est fortement augmentée, comme déjà montré dans le Chapitre 3. Dans le cas des larves dépourvues de cellules microgliales, il semble également y avoir une forte hyperexcitation neuronale, mais la grande variabilité de nos résultats ne permet pas d'obtenir une différence significative (**Figure 24D**), que ce soit avec la

condition « MO PU.1 DMSO » ($p = 0,066$) ou avec la condition « DFP » ($p = 0,87$). Il est donc difficile de conclure face à ce résultat et il serait utile de réitérer l'expérience sur un nombre de larves plus important, afin de voir si l'hétérogénéité des réponses peut être résolue.

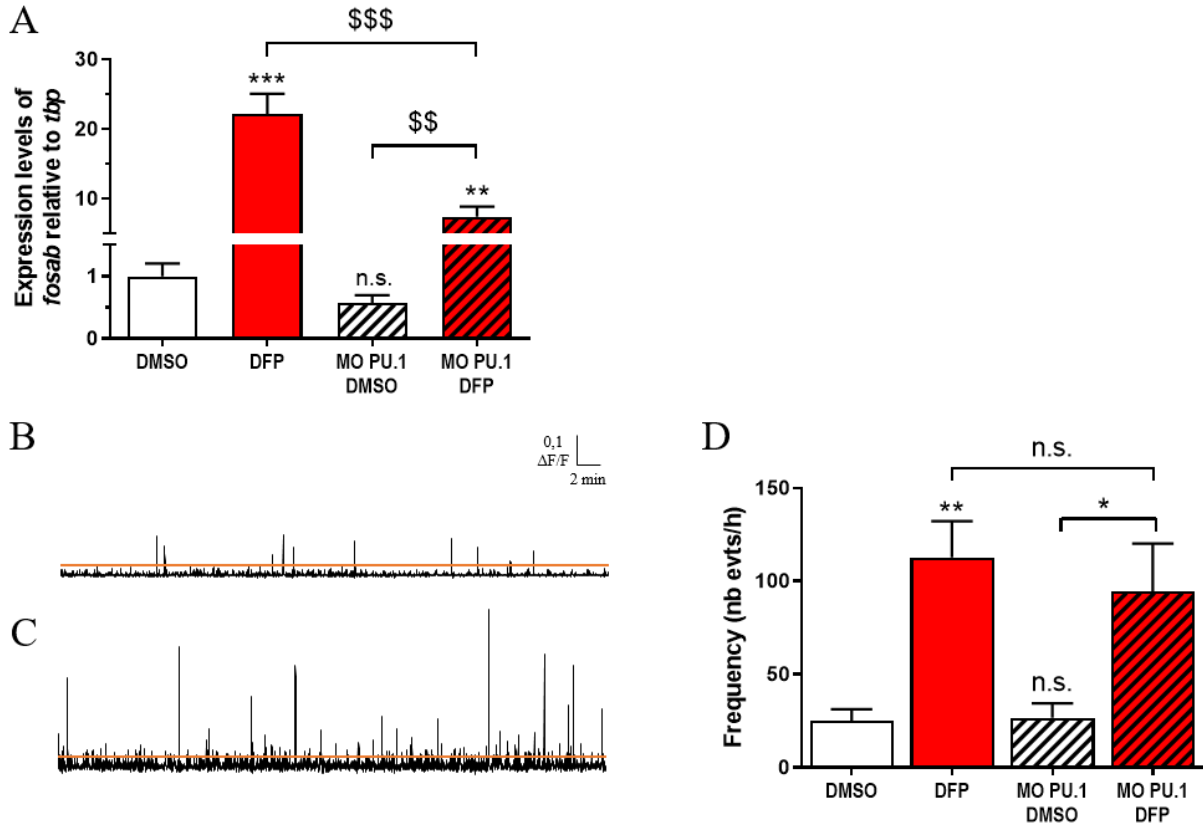


Figure 24 : conséquences de l'ablation de la microglie sur l'activité neuronale après exposition au DFP

(A) Niveaux relatifs d'expression de *fosab* après 6 h de traitement au DMSO ou au DFP dans les larves avec ou dépourvues de microglie ($N = 7 - 8$). (B–C) Enregistrements de l'activité calcique neuronale dans un cerveau de larves dépourvues de cellules microgliales et exposées au DMSO 1% (B) ou au DFP 15 μM (C), entre la 5^{ème} et la 6^{ème} heure de traitement. La ligne orange correspond au seuil à partir duquel un pic est considéré comme un événement calcique ($\Delta F/F_0 = 0,035$). (D) Quantification de la fréquence des événements calciques ($N = 7 - 10$) dans les larves avec ou dépourvues de microglie, et après traitement au DMSO 1% ou DFP 15 μM . Les graphes représentent la moyenne, les barres d'erreur représentent la SEM. Les p -values ont été calculées avec un t -test de Student. Les * ou n.s. indiqués au-dessus des colonnes correspondent à des comparaisons faites avec la condition « DMSO ». Sinon, le symbole \$ est utilisé au-dessus d'un crochet dont les extrémités indiquent les conditions comparées. * ou \$: $p < 0,05$; ** ou \$\$: $p < 0,01$; *** ou \$\$\$: $p < 0,001$. n.s. : non significatif

Chapitre 5 :

Discussion et perspectives

L'ensemble de ce travail a permis d'établir un nouveau modèle d'intoxication aiguë aux OP en utilisant le poisson zèbre. Ce modèle reproduit les caractéristiques principales d'une intoxication aiguë aux OP observées chez l'Homme et chez le rongeur comme l'inhibition de l'AChE, des crises épileptiformes caractérisées par une hyperactivité neuronale et un déséquilibre de la balance synaptique E/I en faveur de l'excitation, une mort cellulaire cérébrale accrue et une paralysie. De plus, la diminution de l'activité locomotrice observée est caractéristique du syndrome cholinergique et serait en lien avec la diminution de l'activité de l'AChE périphérique. Il est à noter cependant que les symptômes locomoteurs caractéristiques d'une crise d'épilepsie chez le poisson zèbre, telles que les convulsions qu'on peut observer dans un modèle d'épilepsie induite par le pentylènetétrazole (PTZ) (Baraban et al. 2005) par exemple, n'ont pas été observés. Les symptômes « pré-locomoteurs » observés (activités calcique et électrique, expression génique de l'activité neuronale) seraient les signes d'une activité de type épileptiforme.

Ce modèle a pour avantage que l'exposition au DFP, notre OP prototypique, se fait facilement par balnéation, contrairement aux modèles murins où il faut généralement réaliser une injection du produit. De plus, les modèles murins nécessitent une injection supplémentaire d'un mélange d'atropine et d'oxime afin de pallier une mort prématurée (Collombet et al. 2011; Guignet et al. 2020; Maupu et al. 2021) due notamment à une insuffisance respiratoire, ce qui n'est pas nécessaire dans notre modèle.

TRAITEMENTS AU DMSO ET AU DFP

Il est à noter dans un premier temps qu'une étude a montré que le DMSO à une concentration supérieure à 0,55% pouvait entraîner des défauts comportements dans les lignées AB, AB/TU et TL (Christou et al. 2020). Cependant, nous avons comparé le comportement des larves des lignées Tg(mpeg1:mcherryF) et Tg(HuC:GCaMP5G) dans la FW et dans de la FW supplémentée de 1% de DMSO, et nous n'avons pas pu observer de différence comportementale significative en termes de distance parcourue et de vitesse de nage (données non montrées). Toutefois, il n'est pas à écarter la possibilité que le DMSO et le DFP interagissent de façon synergique, provoquant une toxicité plus accrue, comme il a été constaté avec le DMSO et le vanadium (Kim and Lee 2021).

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ NEURONALE PAR IMAGERIE CALCIQUE

Un atout supplémentaire et majeur du poisson zèbre est la transparence de ses larves permettant de suivre la dynamique des modifications cellulaires et moléculaires prenant place dans l'organisme vivant simplement à l'aide d'un microscope. Nous avons ainsi pu, dans un premier temps, effectuer de l'imagerie calcique neuronale sur des larves, qui est une méthode alternative pour étudier l'activité neuronale. La technique standard pour enregistrer l'activité neuronale dans les modèles animaux comme la souris ou le rat consiste à enregistrer l'activité électrique des neurones en utilisant des électrodes. L'implantation de ces électrodes requiert malheureusement très souvent une chirurgie assez lourde puisqu'il faut anesthésier les animaux, réaliser une incision pour exposer la boîte crânienne, puis la perforer afin de pouvoir placer les électrodes dans les zones cérébrales d'intérêt (Crouch et al. 2018; Hablitz et al. 2019; Kim and Cho 2018). Dans le cas de la larve de poisson zèbre, l'enregistrement de l'activité électrique est également possible et la perforation de la boîte crânienne se fait directement à l'aide de l'électrode (Afrikanova et al. 2013; Brenet et al. 2019; Liu and Baraban 2019). Dans les deux cas, l'étude de l'activité électrique cérébrale est invasive et peut entraîner de la neuroinflammation, ce qui pourrait potentiellement rendre le cerveau plus susceptible aux crises d'épilepsie. Ainsi, d'autres méthodes pour l'étude de l'activité neuronale ont été mises en place, notamment l'imagerie par fluorescence, avec le développement de bio-senseurs sensibles aux ions calciques. Malheureusement, dans les modèles rongeurs, cette méthode se heurte une nouvelle fois à l'aspect invasif puisque l'imagerie du cerveau des rongeurs nécessite l'ouverture de leur boîte crânienne par craniotomie (Dombeck et al. 2007; Gibson et al. 2014). En revanche, le suivi de l'activité calcique neuronale par imagerie dans le poisson zèbre n'est pas invasif du fait de la transparence des larves. Il suffit alors simplement d'utiliser des lignées transgéniques exprimant un bio-senseur sensible aux ions calciques et exprimé dans les neurones, d'immobiliser ces larves, puis de les placer sous un microscope pour enregistrer les variations de l'intensité de fluorescence de la sonde, afin de suivre leur activité calcique neuronale. De plus, l'imagerie permet d'analyser un plan focal entier, contrairement à l'électrode qui n'enregistre l'activité électrique qu'à un point donné. À l'aide d'un microscope adapté, il est même possible d'imager plusieurs plans focaux afin d'obtenir une tranche de cerveau de quelques microns, voire même d'imager le cerveau entier d'une larve (Ahrens et al. 2013). L'enregistrement de l'activité calcique neuronale est donc spatiotemporel, tandis que celui de l'activité électrique n'est que temporel.

ÉTUDE *IN VIVO* DE LA MICROGLIE ET DE SA DYNAMIQUE PAR IMAGERIE

L'établissement de ce modèle d'intoxication aiguë à un OP a ensuite permis l'étude de la microglie dans ce dernier. Jusqu'à présent, les études sur la microglie humaine se sont souvent basées sur des cultures de microglie provenant de biopsies ou d'autopsies (Lue, Beach, and Walker 2019; Rustenhoven et al. 2015), ou plus récemment sur des cultures issues de cellules souches pluripotentes (Hasselmann and Blurton-Jones 2020; Hedegaard et al. 2020), qui ne tiennent pas compte de l'« environnement naturel » de la microglie. De plus, il a été montré que la culture des cellules microgliales entraîne des différences transcriptionnelles par rapport à des cellules microgliales *ex vivo*, soulignant l'importance de l'environnement de la microglie dans le cerveau. Ainsi, dès 6 heures après la mise en culture de cellules microgliales provenant d'un explant de tissu cérébral, l'expression de nombreux ARN était modifiée, avec presque 2 000 gènes sous-exprimés et plus de 2 000 gènes surexprimés d'un facteur supérieur à 4 (Gosselin et al. 2017). Il est donc nécessaire de réaliser les études de la microglie dans un environnement le plus physiologique possible. Pour pallier ce problème, les chercheurs s'attèlent à l'amélioration des cultures de microglie, notamment en améliorant la composition du milieu de culture, mais surtout en essayant d'incorporer des cellules de leur « environnement naturel » comme les neurones ou d'autres cellules gliales comme les astrocytes (Hedegaard et al. 2020). Ce type de culture est appelé « co-culture ». Une autre proposition d'amélioration est la culture 3D. Cette dernière devient de plus en plus utilisée car elle préserve notamment la forme cellulaire naturelle, elle améliore la différenciation cellulaire et elle permet de se rapprocher de l'expression génique et protéique observée *in vivo* (Hedegaard et al. 2020; Jensen and Teng 2020).

Le poisson zèbre est un modèle animal idéal pour étudier la microglie *in vivo* et en temps réel grâce à la transparence de ses larves. Il permet ainsi de visualiser la microglie dans son environnement naturel, et donc dans les conditions les plus physiologiques possibles, mais aussi de façon non invasive, contrairement aux modèles de rongeurs qui nécessitent une craniotomie pour observer la microglie par microscopie (Füger et al. 2017; Nimmerjahn et al. 2005). Notre étude a ainsi permis d'observer les changements morphologiques et dynamiques de la microglie induits par une exposition au DFP. En effet, à la suite d'une exposition au DFP, les cellules microgliales possèdent moins de prolongements, eux-mêmes moins ramifiés, et leur corps cellulaire s'arrondit : les cellules passent d'un état ramifié à un état amiboïde, qui s'accompagne également d'une mobilité plus importante. L'étude de la répartition des différentes populations

microgliales à l'aide des clusters (**Figure 19J – 19K**) a ensuite permis de montrer que la population de cellules amiboïdes devenait prédominante dans le cerveau des larves intoxiquées au DFP, faisant presque disparaître la population de cellules microgliales ramifiées.

LA MICROGLIE ET L'INFLAMMATION : BÉNÉFIQUES OU NÉFASTES ?

De nombreuses observations suggèrent que d'autres mécanismes, en plus de l'inhibition de l'AChE, contribuent à la neurotoxicité des OP. En particulier, l'inflammation aurait une part importante dans ce processus. La réponse inflammatoire est essentielle au maintien de l'homéostasie, mais elle a le potentiel de causer des effets délétères si elle est excessive ou incontrôlée. En effet, la surproduction de cytokines pro-inflammatoire et une inflammation excessive sont caractéristiques de nombreuses pathologies dégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Blasko et al. 2004; Whitton 2007). En outre, dans le cas de crises d'épilepsie, la neuroinflammation peut aussi bien être une conséquence qu'un élément déclencheur (Vezzani et al. 2011). De fait, on sait d'une part que l'induction de crises d'épilepsie chez le rat et la souris par des chimioconvulsants ou par stimulation électrique provoque une induction rapide de médiateurs pro-inflammatoires (Minami, Kuraishi, and Satoh 1991; De Simoni et al. 2000; Vezzani et al. 2010). D'autre part, l'injection à des rats de lipopolysaccharide (LPS), un antigène d'origine bactérienne largement utilisée pour stimuler des réponses immunitaire et inflammatoire, provoque la libération rapide et prolongée de glutamate, à l'origine d'une excitation neuronale importante (Wang and White 1999). Chez la souris, il a d'ailleurs été montré que cette exposition au LPS augmente la susceptibilité du cerveau des animaux à générer des crises d'épilepsie (Sayyah, Javad-Pour, and Ghazi-Khansari 2003). En somme, la neuroinflammation contribue considérablement à la détermination du seuil de sensibilité des crises (*seizure threshold* en anglais) et joue donc un rôle dans la genèse des crises et leur récurrence (Vezzani et al. 2013).

Dans le cadre de l'intoxication aux OP, on suppose que l'inflammation induite est neurotoxique. En effet, en plus des éléments déjà évoqués ci-dessus, beaucoup de molécules thérapeutiques ont des effets anti-inflammatoires, et ces propriétés anti-inflammatoires ont montré un effet neuroprotecteur (Amitai et al. 2005; Cowan et al. 2003). Par exemple, il a été montré que les benzodiazépines, utilisées comme anticonvulsivants pour le traitement des intoxications aux OP, inhibent la libération de médiateurs pro-inflammatoires (Bidri et al.

1999). De plus, des études montrent que la neuroinflammation exacerbe les dommages neuronaux due à l'excitotoxicité (Morimoto, Murasugi, and Oda 2002).

Au niveau du SNC, la réponse inflammatoire est initiée via l'activation de la microglie et/ou des astrocytes, ce qui engendre la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines (Banks and Lein 2012). Il est également bien établi que la microglie activée produit des ROS et des RNS (espèces réactives de l'azote, ERA en français) qui contribuent à perpétuer la réponse inflammatoire (Guignet et al. 2020). De plus, les cytokines sécrétées par la microglie peuvent activer les astrocytes, qui vont à leur tour produire des ROS et des RNS, et contribuer à amplifier la réponse inflammatoire. Des études ont montré que le stress oxydatif et la neuroinflammation induits par une exposition au DFP, deux processus extrêmement liés, surviennent rapidement et peuvent même persister jusqu'à 2 mois post-exposition dans certaines régions du cerveau (Sisó et al. 2017).

En plus de sa contribution à la neuroinflammation, des études ont montré que la microglie peut également induire de la mort neuronale et de la neurogenèse aberrante après des crises d'épilepsie (Andoh et al. 2019). En particulier, l'administration de minocycline, un antibiotique ayant des propriétés anti-inflammatoires et souvent utilisé pour inhiber l'activation microgliale, a permis d'inhiber la neurodégénérescence induite par les crises d'épilepsie (Wang et al. 2015), suggérant ainsi qu'à la suite de crises, la microglie activée promeut la mort neuronale. Une neurogenèse aberrante a également été observée dans des études qui suggèrent que cette dernière induirait à son tour des crises en formant des circuits neuronaux ectopiques (Parent et al. 2006). Cette neurogenèse excessive serait modulée par la microglie puisque l'inhibition de son activation par la minocycline a pour conséquence de diminuer le nombre de nouveaux neurones à la suite de crises (Yang et al. 2010).

Malgré tout, des éléments suggèrent que la réponse inflammatoire microgliale a un rôle neuroprotecteur. En effet, il a été rapporté que l'activation gliale due à une intoxication aux OP induit la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , comme montré dans nos résultats (Chapitre 4 : Étude de la microglie), le TNF- α et l'IL-6, qui sont soupçonnées de promouvoir des dommages inflammatoires, mais aussi d'autres cytokines, notamment des facteurs neurotrophiques et de croissance, qui promeuvent l'angiogenèse et la neurogenèse, contribuant ainsi à la régénération des dommages causés par les OP (Collombet et al. 2011). De plus, certains auteurs rapportent un effet neuroprotecteur de la microglie, qui modulerait la

plasticité synaptique, serait capable de suppléer les astrocytes défaillants en favorisant la recapture d'excitotoxines comme le glutamate (Chrétien et al. 2002; Van Landeghem et al. 2001), et qui diminuerait l'activité neuronale, protégeant ainsi le cerveau d'une activité neuronale excessive (Badimon et al. 2020; Eyo et al. 2014; Y. Li et al. 2012).

L'ABLATION DE LA MICROGLIE

Les données actuelles ne permettent pas de déterminer si la microglie a plutôt un rôle neuroprotecteur ou un rôle neurotoxique dans un cerveau sensible aux crises (Andoh et al. 2019). Pour avoir une idée du rôle de la microglie dans notre modèle d'intoxication aiguë au DFP, nous avons réalisé l'ablation de la microglie par microinjection d'un morpholino dirigé contre PU.1. Dans un premier temps, nous avons pu observer une nette diminution des transcrits de cytokines pro-inflammatoires entre les larves exposées au DFP sans et avec cellules microgliales (**Figure 23**), en concordance avec ce que l'on sait, c'est-à-dire que la microglie est un acteur principal de l'inflammation dans le SNC (L. Xu, He, and Bai 2016). Dans un second temps, les résultats obtenus pour les conséquences sur l'activité neuronale en l'absence de microglie sont pour l'instant un peu plus mitigés. En effet, nos résultats sur l'expression de *fosab* vont dans le sens de notre hypothèse : l'absence de microglie a entraîné une diminution partielle de la surexpression des cytokines pro-inflammatoires suite à l'exposition au DFP, ce qui entraîne à son tour une diminution de l'excitabilité neuronale. Cependant, nos données actuelles sur l'activité calcique neuronale, obtenues par imagerie calcique *in vivo*, ne permettent pas de confirmer cette hypothèse. Il faudrait donc augmenter le nombre d'animaux sur lequel l'activité calcique neuronale est mesurée. Une fois que l'expérience aura été réitérée sur un nombre suffisant de larves, 2 cas sont possibles :

- (1) On observe une diminution de l'activité calcique neuronale après exposition au DFP et en l'absence de microglie par rapport à la condition « DFP », ce qui permet de confirmer notre hypothèse, déjà appuyée par nos résultats obtenus avec *fosab*. La microglie aurait donc un rôle globalement néfaste dans notre modèle d'intoxication, car elle participerait au cercle vicieux de l'inflammation et de l'excitabilité neuronale.

- (2) On n'observe aucune différence d'activité calcique neuronale entre les conditions « DFP » et « MO PU.1 DFP », ou bien on observe une augmentation de l'activité calcique neuronale dans les larves « MO PU.1 DFP » par rapport aux larves « DFP ». Dans ces 2 cas, les résultats de l'activité calcique neuronale et ceux obtenus avec *fosab* ne coïncident pas et ne nous permettent pas de conclure sur le rôle bénéfique ou néfaste de la microglie vis-à-vis de l'excitabilité cérébrale.

Dans ce dernier cas, plusieurs questions se posent. Quel « marqueur » est plus pertinent entre l'expression de *fosab* et l'activité calcique neuronale ? Quel autre « marqueur » pourrait-on étudier pour avoir une meilleure idée des conséquences de l'absence de la microglie sur l'excitabilité cérébrale ? Réaliser un EEG ou développer une méthode d'analyse plus avancée des enregistrements de l'activité calcique pourraient être des pistes d'amélioration.

D'autre part, il est possible que le cerveau des larves soit devenu trop sensible au laser utilisé pour l'imagerie calcique et/ou à l'exposition au DFP du fait de l'absence de la microglie. En effet, l'injection du morpholino au stade une cellule a pour conséquence que la microglie n'est pas présente dans le cerveau encore en formation des larves. Cela signifie qu'elle n'a pas pu remplir ses différents rôles au cours du développement, comme l'élagage des synapses surnuméraires ou la phagocytose des neurones immatures entre autres. De plus, les effets observés dans les larves injectées avec le MO peuvent être dus à des effets secondaires *off-target*. Par exemple, il est estimé que 10% à 20% des MO injectés provoquent une toxicité neurale, qui peut masquer ou exacerber certains défauts (Bedell, Westcot, and Ekker 2011; Tran, Faccioli, and Gerlai 2020). Cette toxicité neurale serait due à des effets *off-target* qui induisent l'activation de p53, responsable de l'apoptose neurale observée (Robu et al. 2007). Ainsi, l'ablation de la microglie par injection de morpholino n'est peut-être pas optimale dans notre étude. En effet, comme évoqué ci-dessus, le cerveau de l'embryon de poisson zèbre injecté avec le MO PU.1 ne « voit » jamais la microglie lors de son développement. De plus, le morpholino dirigé contre PU.1 n'est probablement pas spécifique de la microglie puisque des souris KO PU.1 ne présentaient ni macrophages, ni neutrophiles, ni lymphocytes B et T matures (Olson et al. 1995). Ainsi, l'ablation de la microglie dès les premiers instants de vie pourrait avoir des répercussions potentiellement néfastes sur le bon développement du cerveau des larves. Il conviendrait alors de réaliser cette ablation autrement. Une « meilleure » méthode serait l'utilisation d'une lignée qui exprime une nitroréductase (NTR) sous un promoteur spécifique de la microglie comme *apoeb* ou *p2ry12* par exemple. Cette NTR, codée par le gène

nfsB d'origine bactérienne, permet de catalyser la réduction du métronidazole (MTZ), un antibiotique inoffensif qui produit, après réduction par la NTR, un composé cytotoxique qui induit ensuite la mort cellulaire. Ainsi, l'expression de la NTR sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la microglie permettrait de provoquer la mort des cellules microgliales spécifiquement, grâce à l'exposition des larves au MTZ pendant 12 à 24 heures (Curado, Stainier, and Anderson 2008; Pisharath and Parsons 2009). Cette méthode possède plusieurs avantages par rapport à l'injection de morpholino :

- La reproductibilité : exposer les embryons au MTZ est plus facile et reproductible que la microinjection. En effet, on peut exposer un grand nombre d'embryons à la même solution de MTZ, ce qui permet de réduire le facteur de variabilité et d'augmenter le nombre d'embryons dépourvus de microglie, car la microinjection peut engendrer de la mortalité.
- La spécificité : en choisissant correctement le promoteur sous lequel la NTR est exprimée, on pourra réaliser l'ablation d'un type cellulaire spécifique, ici la microglie.
- Le contrôle temporel : on peut réaliser l'ablation du type cellulaire d'intérêt à n'importe quel moment, ce qui signifie pour cette étude qu'on peut effectuer l'ablation à 4 jpf, ce qui aura laissé le temps à la microglie de réaliser son rôle dans le développement du cerveau au moins dans les tous premiers stades. Cela permettra d'étudier avec une meilleure certitude les conséquences directes de l'absence de la microglie dans notre modèle d'intoxication aiguë à un OP et non les conséquences indirectes du fait de son absence lors du développement.

Par ailleurs, cette technique d'ablation est réversible. Il suffit pour cela de retirer les embryons de la solution de MTZ et de procéder à quelques lavages. Le rétablissement du tissu ou du type cellulaire d'intérêt se fera dans les 24 heures suivantes (Curado et al. 2008). Il est également possible de fusionner l'expression de la NTR avec celle d'une protéine microgliale fluorescente pour visualiser l'ablation en temps réel (Pisharath and Parsons 2009).

Cette technique permet donc de réaliser l'ablation de la microglie une fois le cerveau des larves bien développé. Ainsi, les effets observés, que ce soit au niveau de l'inflammation ou au niveau de l'activité neuronale, seront attribuables à l'absence de la microglie de façon un peu

plus certaine et la variabilité obtenue pour les enregistrements de l'activité calcique neuronale sera peut-être moindre.

Une autre possibilité pour déterminer si la microglie est bénéfique ou néfaste dans notre modèle serait d'inhiber son activation. En effet, nous avons pu observer des changements morphologiques et dynamiques de la microglie (**Figure 19** et **Figure 20**), ainsi qu'une forte surexpression des cytokines pro-inflammatoires étudiées dans le cerveau des larves exposées au DFP (**Figure 21** et **Figure 22**), caractéristiques de son activation. L'étude des conséquences de l'intoxication au DFP après inhibition de cette activation par la minocycline par exemple (Wang et al. 2015) pourrait donc compléter ces résultats et nous permettre de mieux comprendre le rôle de la microglie.

Par ailleurs, il est également intéressant de noter que nous avons fait le choix de travailler sur des larves de 5 jpf. Ce stade est en effet un bon compromis entre le développement du cerveau et le temps de génération des animaux. Cependant, cela reste un stade précoce. Il est difficile d'établir une équivalence avec l'âge humain mais 2 éléments de réponse peuvent être apportés. D'une part, si on se base sur la longévité d'un poisson zèbre (environ 3-3,5 ans) et celle d'un Homme (environ 80 ans), 1 mois de poisson zèbre correspondrait à 2 ans d'âge humain (Gilbert, Zerulla, and Tierney 2014), soit une correspondance entre un nourrisson de 4 mois et une larve de poisson zèbre de 5 jpf. D'autre part, si on se base sur le développement du CNS, et plus particulièrement de la BHE, une larve de poisson zèbre de 3 jpf correspondrait à un humain entre le 3^{ème} trimestre de gestation et 4 mois d'âge (Haddad-Tóvolli, Dragano, Ramalho, & Velloso, 2017; R. Webster). Cela suggère donc une correspondance entre une larve de 5 jpf et un nouveau-né, en cohérence avec la première méthode de comparaison.

De plus, comme précédemment évoqué (Chapitre 1, IV - 4.3. Développement cérébral et colonisations microgliales), le poisson zèbre subit 2 vagues de colonisation microgliale, la première population étant complètement remplacée par la deuxième. Il n'est pas certain que ces 2 populations réagissent de la même façon. En effet, il reste encore à déterminer si les différentes voies développementales de la microglie primitive et de la microglie définitive leur confèrent des fonctions différentes (Ferrero et al. 2018). Il serait donc intéressant de réaliser cette même étude de la microglie sur des stades plus tardifs, où la microglie définitive est en place. On pourrait par exemple réaliser l'étude à partir de 3 mois, stade auquel la microglie

définitive est prédominante par rapport à la microglie primitive, voire même sur des adultes d'un an, auxquels cas lignée *casper*, dont les adultes sont transparents, sera utile.

TRAITEMENTS

Les traitements actuels contre l'intoxication aiguë aux OP doivent être administrés dans les minutes qui suivent l'exposition pour être efficaces. Par exemple, le diazepam et le midazolam sont des benzodiazépines avec des effets anticonvulsivants efficaces s'ils sont administrés dans les 30 minutes suivant l'exposition, mais peu voire pas efficaces si administrés 1 h à 2 h après (Reddy 2019a). Bien que les forces militaires aient accès à des auto-injecteurs contenant un cocktail de sulfate d'atropine, de pralidoxime et de benzodiazépine (Rousseau et al. 2009), un tel délai n'est pas réaliste dans un contexte de guerre chimique ou d'attaque terroriste sur la population civile par exemple. De plus, le passage au niveau de la BHE des oximes actuellement utilisées n'est que très limité voire inexistant du fait de la polarité de ces molécules. Cette polarité se traduit par un caractère hydrophile qui explique le non passage de la BHE, ce qui représente une de leurs limites majeures puisque cela signifie que ces molécules ne peuvent pas agir au niveau du SNC (Kalász et al. 2015). L'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc essentielle pour le traitement des intoxications aux OP et pour permettre une meilleure récupération suites aux défauts engendrés par l'intoxication aiguë (Collombet et al. 2011). Dans cette optique, notre modèle pourrait contribuer à la recherche de tels traitements. En effet, on pourrait l'utiliser pour faire du criblage à haut débit de molécules en se basant sur le rétablissement ou non de la paralysie induite par le DFP. Il pourrait également être utilisé pour faire du criblage à moyen débit en se basant sur la consommation d'O₂ des larves, une fois les expériences complémentaires réalisées (cf. Chapitre 3 : Établissement du modèle, Discussion et perspectives). Les quelques molécules retenues pourront ensuite être étudiées plus précisément pour voir leurs effets sur l'activité calcique neuronale, l'inflammation et la microglie. Pour cribler les molécules selon divers autres paramètres, d'autres tests comportementaux pourront aussi être développés, comme par exemple la capacité des larves à répondre à une stimulation lumineuse ou à une stimulation électrique, mais aussi des tests permettant d'évaluer le niveau d'AChE réactivée (Dubrana et al. 2021). D'autre part, les travaux déjà effectués sur la microglie et les perspectives proposées (ablation de la microglie par le MTZ, inhibition de l'activation microgliale par la minocycline) permettront d'avoir une idée plus claire sur le rôle de la microglie dans l'intoxication aiguë aux OP. Des stratégies

thérapeutiques ciblant la microglie pourront alors être développées pour inhiber ou amplifier son activité, selon son action neurotoxique ou neuroprotectrice.

Les recherches de nouvelles stratégies thérapeutiques ces dernières années ont permis de proposer certaines pistes. Parmi ces dernières, on peut citer la piste des enzymes *bioscavengers* pour la prophylaxie, la décontamination externe et le traitement, permettant de piéger ou de dégrader les OP (Jacquet et al. 2019). Ce type d'enzymes neutralise les molécules d'OP dans la circulation sanguine de façon stœchiométrique, auquel cas les enzymes piègent la molécule, l'empêchant ainsi d'atteindre ses cibles physiologiques (les cholinestérases), ou de façon catalytique, auquel cas les enzymes piègent la molécule d'OP, puis la dégradent. Dans le cas d'un *bioscavenger* stœchiométrique, il est également possible de le coupler à un réactivateur, ce qui permet d'obtenir un système pseudo-catalytique : l'enzyme piège la molécule d'OP, puis le réactivateur se lie avec l'OP, libérant ainsi l'enzyme qui peut répéter ce cycle (Figure 25).

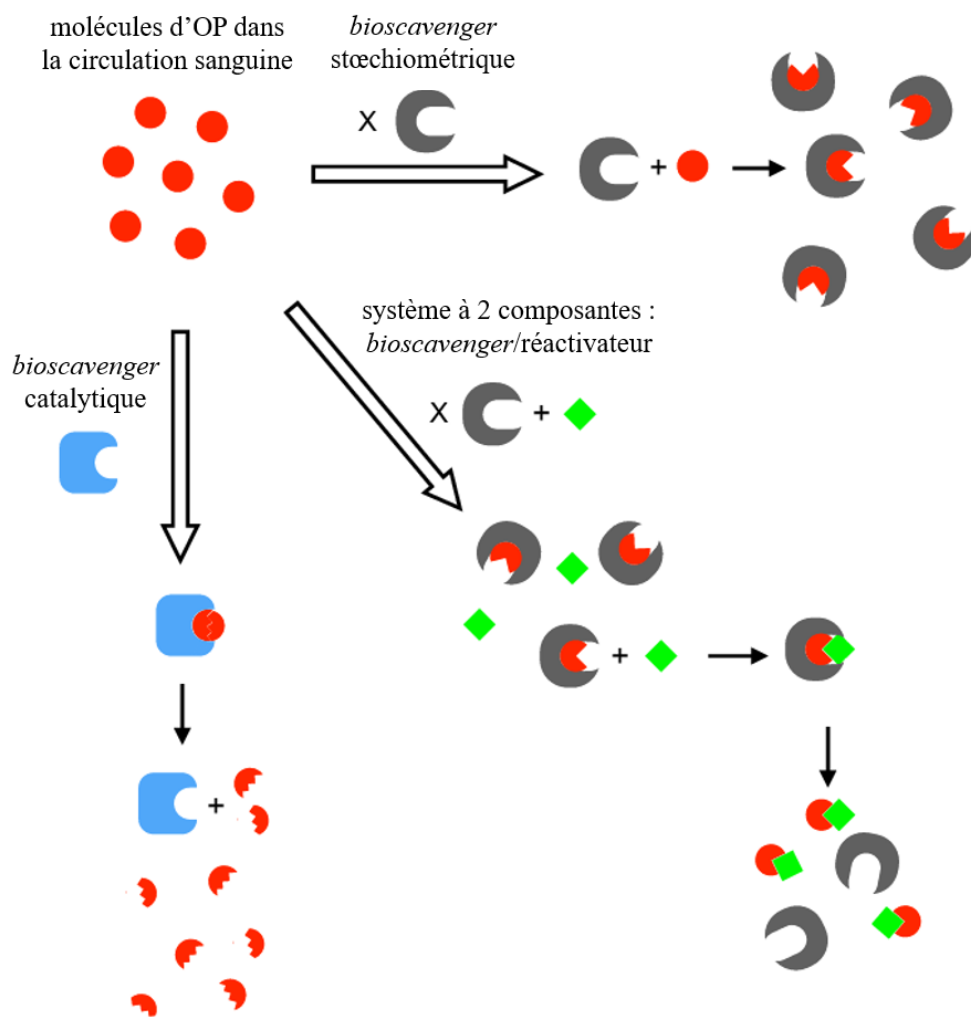


Figure 25 : Stratégies de neutralisation des OP à l'aide de bioscavengers

Les *bioscavengers* stœchiométriques piègent les molécules d'OP dans la circulation sanguine avant qu'elles n'atteignent leurs cibles physiologiques. Le système *bioscavenger*/réactivateur permet d'obtenir un système pseudo-catalytique grâce à la libération de l'enzyme par le réactivateur. Les *bioscavengers* catalytiques piègent puis dégradent la molécule d'OP par hydrolyse rapide. Le produit résultant n'est pas toxique. Traduit de Masson and Nachon (2017)

Une autre piste de traitement est celle des neurostéroïdes. Les neurostéroïdes sont des stéroïdes synthétisés dans le cerveau, et qui n'ont pas les effets « conventionnels » des hormones. Ces derniers altèrent rapidement l'excitabilité neuronale via des actions non-génomiques et agissent comme modulateurs allostériques positifs et activateurs directs des récepteurs au GABA_A, mais se fixent sur des récepteurs distincts de ceux au GABA et des benzodiazépines (Reddy 2019a). Par ailleurs, les neurostéroïdes se sont montrés plus efficaces que les benzodiazépines, qu'ils aient été administrés 40 minutes après l'exposition aux OP ou plus tard, contrôlant rapidement et efficacement l'état de mal épileptique et les dommages neuronaux induits chez le rat (Reddy, 2019, US 10,172,870 B2). Certains neurostéroïdes sont même en cours de développement pour approbation par la *Food and Drug Administration* (FDA) aux États-Unis et un brevet a été déposé en 2019 (Reddy, 2019, US 10,172,870 B2).

L'inflammation et le stress oxydatif étant soupçonnés d'être fortement impliqués dans la neurotoxicité des OP, certaines stratégies de traitement s'orientent vers cette piste en proposant de nouvelles molécules aux propriétés anti-inflammatoires ou anti-oxydantes. Pour soutenir cette hypothèse, des chercheurs ont montré qu'un traitement de rats exposés au DFP avec des antioxydants catalytiques atténuait significativement le stress oxydant et la neuroinflammation induits par le DFP, ces résultats coïncidant avec l'observation d'une diminution de la neurodégénérescence (Guignet et al. 2020; Naughton and Terry 2018).

Enfin, une autre stratégie prometteuse s'oriente vers le processus de vieillissement de l'adduit AChE-OP. Une possibilité est de développer des molécules qui retardent le vieillissement de l'AChE inhibée par l'OP. En effet, le processus de vieillissement est une réaction de déalkylation de l'OP lié de façon covalente à l'AChE, ce qui résulte en une forme de l'adduit AChE-OP qui est résistante aux oximes (**Figure 5**). Le retardement de ce vieillissement permettrait donc aux oximes d'être efficaces sur une période post-exposition plus longue. Ainsi, des études ont montré qu'il était possible de ralentir le processus de vieillissement de l'AChE inhibée par le soman de 33-69% (Berry and Davies 1966), inhibée par le cyclosarin de 52-100% (Berry and Davies 1966), et inhibée par le sarin de 77% (Crone

1974). De façon intéressante, il a été rapporté que l'atropine, un antagoniste des récepteurs cholinergiques largement utilisé dans le traitement des intoxications aux OP, ralentissait également le vieillissement de l'AChE inhibée, qu'elle soit d'origine humaine ou murine, de 28-60% lorsqu'appliquée à 1 mM (Van Dongen, Elskamp, and De Jong 1987). Une autre possibilité qui semble plus prometteuse serait de réalkyler l'AChE vieillie, ce qui permettrait de revenir à une forme inhibée de l'AChE, qui peut être réactivée par les oximes actuelles. Cependant, de tels composés ne sont pas entièrement développés. Récemment, Franjesevic *et al.* (2019) ont rapporté qu'ils avaient réussi à synthétiser des molécules, des bases dites de Mannich, qui permettent la « résurrection » de l'AChE vieillie en AChE active. Bien que ces molécules n'aient permis la « résurrection » que de petites quantités d'AChE active à partir d'AChE vieillie, ces recherches sont très prometteuses et seraient révolutionnaires pour le traitement des intoxications aux OP.

Conclusion générale

Les organophosphorés sont des composés aux propriétés neurotoxiques, utilisés dans les pesticides et dans les armes chimiques. Ils constituent une menace pour l'ensemble de la population civile et militaire dans le cas d'attaque terroriste, comme l'illustre l'attaque au sarin dans le métro de Tokyo en 1995. Des cocktails d'antidotes existent mais ils doivent être administrés dans les minutes suivant l'intoxication pour être efficaces, après quoi, certains de ces traitements (benzodiazépines et oximes notamment) sont inefficaces contre l'intoxication aiguë. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes liés à cette intoxication afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour pallier cette résistance.

Ce travail a permis d'établir un nouveau modèle d'intoxication aiguë à un OP utilisant le poisson zèbre. Ce modèle reproduit les principales caractéristiques d'une intoxication aiguë à un OP observées chez l'Humain, à savoir une inhibition de l'AChE, une paralysie, un déséquilibre de la balance synaptique E/I, une mort cellulaire cérébrale accrue et une diminution de la consommation d'O₂. En plus de ces défauts, nous avons observé une inflammation importante à la suite de l'exposition de nos larves de poisson zèbre au DFP, en accord avec ce qui a été observé dans les modèles murins. En s'intéressant de plus près à la microglie, les cellules immunitaires résidentes du SNC et acteur majeur de la neuroinflammation, nous avons pu observer des modifications morphologiques et dynamiques de ces cellules, suggérant fortement leur activation de type pro-inflammatoire. Leur rôle neuroprotecteur ou neurotoxique n'étant pas clairement élucidé, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de ces cellules dans le cadre d'une intoxication au DFP. Pour cela, l'ablation de la microglie a été réalisée et nous avons pu observer, comme attendu, une diminution de l'inflammation à la suite d'une exposition au DFP. Cette étude a également montré une diminution de l'expression des transcrits de *fosab*, un gène immédiat précoce utilisé comme marqueur de l'activité neuronale. Cependant, une fréquence d'activité calcique neuronale semblable à celle des larves avec microglie a été observée. Il est donc nécessaire de compléter ces résultats d'une part en augmentant le nombre d'animaux étudiés, et d'autre part, en utilisant d'autres méthodes d'ablation de la microglie et/ou d'inhibition de l'activation microgliale. La microglie pourra ensuite être ciblée pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques qui exacerbent ou inhibent son activité selon qu'elle soit bénéfique ou néfaste, et le modèle pourra être utilisé pour réaliser du criblage de molécules à moyen et haut débit.

L'ensemble de ce travail montre la diversité des techniques disponibles dans le modèle du poisson zèbre et les avantages que nous apportent ce petit vertébré, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires, à l'origine de la neurotoxicité des OP. À terme, cela pourra contribuer à la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques.




Annexes

Avant-propos

Lors de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler sur le projet d'un autre doctorant au sein de mon équipe, dont le travail portait sur le syndrome de Dravet. Le syndrome de Dravet est une épilepsie grave et rare d'origine génétique qui touche les jeunes enfants. Il se caractérise notamment par la répétition de crises longues et par des altérations du comportement et de l'apprentissage (www.dravet.fr). Depuis 2001, une mutation du gène *SCN1A* rendant le gène non fonctionnel est reconnue comme étant à l'origine de cette maladie. Ce gène code pour une sous-unité d'un canal sodique, qui se trouve principalement dans le cerveau. Cependant, les mécanismes à l'origine de l'hyperexcitation neuronale induite par la perte de fonction de *SCN1A* ne sont que peu étudiés. Pour pallier ce manque, le poisson zèbre a été utilisé pour modéliser le syndrome de Dravet par déplétion du gène *scn1lab*, un des deux orthologues de *SCN1A* dans le poisson zèbre. Des crises épileptiformes ont ainsi été observées dans les larves de poisson zèbre dont le gène *scn1lab* avait été rendu non-fonctionnel, et ce de façon récurrente. De plus, un déséquilibre des balances synaptique et neuronale E/I en faveur de l'excitation a également pu être observé, avec une diminution de la densité des synapses inhibitrices, une augmentation de celle des synapses excitatrices, et une proportion de neurones excitateurs plus importante. Dans l'ensemble, ces résultats contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes qui seraient à l'origine de l'hyperexcitation neuronale dans le syndrome de Dravet.

Article

Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome

Alexandre Brenet , Rahma Hassan-Abdi, Julie Somkhit , Constantin Yanicostas and Nadia Soussi-Yanicostas * 

Université de Paris, NeuroDiderot, Inserm, F-75019 Paris, France; alexandre.brenet@inserm.fr (A.B.); rahma-hassan.abdi@inserm.fr (R.H.-A.); julie.somkhit@inserm.fr (J.S.); constantin.yanicostas@inserm.fr (C.Y.)

* Correspondence: nadia.soussi@inserm.fr; Tel.: +00-33140-03-1931

Received: 13 August 2019; Accepted: 3 October 2019; Published: 4 October 2019



Abstract: Dravet syndrome is a type of severe childhood epilepsy that responds poorly to current anti-epileptic drugs. In recent years, zebrafish disease models with *Scn1Lab* sodium channel deficiency have been generated to seek novel anti-epileptic drug candidates, some of which are currently undergoing clinical trials. However, the spectrum of neuronal deficits observed following *Scn1Lab* depletion in zebrafish larvae has not yet been fully explored. To fill this gap and gain a better understanding of the mechanisms underlying neuron hyperexcitation in *Scn1Lab*-depleted larvae, we analyzed neuron activity in vivo using combined local field potential recording and transient calcium uptake imaging, studied the distribution of excitatory and inhibitory synapses and neurons as well as investigated neuron apoptosis. We found that *Scn1Lab*-depleted larvae displayed recurrent epileptiform seizure events, associating massive synchronous calcium uptakes and ictal-like local field potential bursts. *Scn1Lab*-depletion also caused a dramatic shift in the neuronal and synaptic balance toward excitation and increased neuronal death. Our results thus provide in vivo evidence suggesting that *Scn1Lab* loss of function causes neuron hyperexcitation as the result of disturbed synaptic balance and increased neuronal apoptosis.

Keywords: Dravet syndrome; Calcium imaging; Local field potential; Excitatory/inhibitory balance; Apoptosis; In vivo imaging; Zebrafish; *scn1Lab*; Morpholino *scn1Lab*^{AUG}

1. Introduction

Dravet syndrome (DS) is a type of severe drug-resistant childhood epilepsy. It is associated with several comorbidities, including intellectual disability, irreversible psychomotor deficits, behavioral disorders, and high mortality at around 10 years of age [1,2]. DS is a genetic disease, caused in 80% of cases by de novo loss of function mutations in the *SCN1A* gene encoding the alpha-1 subunit of the main voltage-dependent sodium channel in inhibitory interneurons [3], whose synapses mainly release GABA, a neurotransmitter that inhibits excitation of post-synaptic neurons [4].

Among animal models that have been developed in recent years, the zebrafish has proved to be a versatile and powerful system for in vivo epilepsy research [5–7]. In particular, zebrafish larvae with loss of function of the *scn1Lab* gene, one of the two zebrafish orthologs of *SCN1A*, have already been used as animal models to find novel antiepileptic drug candidates, several of which are now undergoing clinical trials [8–10].

However, while *Scn1Lab*-depleted larvae have been established as a bona fide epilepsy model [7–15], the spectrum of neuronal deficits induced by the loss of function of this sodium channel has not yet been fully explored. To fill this gap, we first combined transient calcium uptake imaging

and local field potential recording to analyze neuron hyperactivity at whole brain levels in real time. In *Scn1Lab*-depleted larvae, we observed recurrent events associating massive synchronous calcium uptakes and ictal-like local field potential bursts characteristic of epileptiform seizures. Importantly, we also observed that these larvae displayed a marked deficit in the number of inhibitory synapses, together with a dramatic over-accumulation of excitatory ones, heavily disrupting the synaptic balance, which was correlated with a shift in the neuronal population toward excitatory neurons. Last, we observed that loss of function of this sodium channel caused increased neuronal apoptosis. Taken together, our findings are evidence that *Scn1Lab*-depletion causes epileptiform seizures as a result of brain development defects that include impaired synaptic balance and increased neuronal death.

2. Materials and Methods

2.1. Fish Maintenance and Transgenic Lines

Adult zebrafish were raised at 26.5 °C in standard aquaculture conditions with a 14 h light/10 h dark cycle. Embryos collected by natural spawning were raised in E3 medium complemented with 0.002% methylene blue and kept at 28.5 °C. 0.003% phenylthiourea (PTU; Sigma) was added at 1 day post-fertilization (dpf) to inhibit pigmentation. The mutant *scn1Lab* (*didy*^{S552}) was a gift from Dr. Scott Baraban (University of California, San Francisco, USA), the HuC:GCaMP5G transgenic line was a gift from Dr. George Debrégeas (Laboratoire Jean Perrin, Paris) and the *Gad1b*:GFP; *Vglut2a*:DsRed double transgenic line was a gift from Dr Germán Sumbre (IBENS, Paris).

All the animal experiments described in the present study were conducted at the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) UMR 1141 in Paris in accordance with European Union guidelines for the handling of laboratory animals (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm), and were approved by the Direction Départementale de la Protection des Populations de Paris and the French Animal Ethics Committee under reference No. 2012-15/676-0069.

2.2. Morpholino

Antisense morpholino-oligonucleotide (MO) (5'-CTGAGCAGCCATATTGACATCCTGC-3'), obtained from Gene Tools, was used to block the *scn1Lab* zebrafish mRNA translation. One- to two-cell embryos were injected with 1 pmol MO *scn1Lab*^{AUG}, 0.53 ng rhodamine B dextran and 0.1 mM KCl.

2.3. Locomotor Activity

Larvae locomotor activity (i.e., movement) was evaluated using the Zebrabox, an infrared automated recording and tracking device supported by ZebraLab software (Viewpoint, Lyon, France). Each 96-well plate containing 4 dpf control, morphant or mutant larvae in 200 µL E3 medium was placed in the Zebrabox recording chamber. In all locomotion recording protocols, animal color was set to dark and detection threshold to 15. After 45 min habituation in darkness, larvae were simultaneously tracked for 25 min. Larvae movement in each well was computed as the sum of all pixels for which intensity changed during the recording, and plotted as "acting units".

2.4. Calcium Imaging

4 dpf zebrafish larvae were paralyzed using 300 µM pancuronium bromide (PB, Sigma) and immobilized dorsal-side down at the center of a recording chamber in 1.2% low-melting agarose covered with E3 medium containing 0.003% PTU and 300 µM PB. The chamber was then placed on an inverted a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 20x/multi-immersion 0.75 objective. Calcium uptake events were detected by recording the fluorescence of a 512 × 512-pixel image of a single focal plane at 2 Hz for 1 h. Fluorescence intensity of the optic tectum was measured using ImageJ software. Fluorescence variations ($\Delta F/F_0$) were calculated by subtracting the mean fluorescence intensity of all frames and normalizing the mean fluorescence intensity of all frames.

The fluorescence drift over time was corrected by subtracting the mean value of the lowest values (all values under the median) within a 20 s sliding window around the point. All fluorescence increases greater than $0.04 \Delta F/F_0$ were considered as calcium events. Since the detection system may detect false events, all of them were manually checked.

2.5. Local Field Potential Recording

4 dpf zebrafish larvae were paralyzed using 300 μM PB and immobilized, ventral-side down, in 2% low-melting agarose covered with E3 medium containing 300 μM PB. A glass electrode (5–6 $\text{M}\Omega$) filled with artificial cerebrospinal fluid composed of 10 mM HEPES, 134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 2.1 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , 10 mM glucose; pH 7.8, was placed in the left neuropil of the optic tectum of the larva. The recordings were performed for 1 h in a current clamp mode at 10 μs sampling interval and with a 0.1 Hz high-pass filter, 1 kHz low-pass filter and digital gain at 10 (MultiClamp 700B amplifier, Digidata 1400 digitizer, both Molecular Devices). Results were analyzed with the Clampfit software (Molecular Devices, San José, CA, USA). Events were defined as every downward membrane potential variation under -0.3 mV amplitude and lasting more than 100 ms.

2.6. Synapse Immunostaining

4 dpf control and morphant larvae were fixed with 4% formaldehyde for 1 h 30 min at room temperature and stored at 4 °C in PBS containing 0.02% sodium azide. Fixed larvae were transferred to 15% sucrose at 4 °C overnight and then embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose, flash frozen in isopentane at -45 °C and stored at -80 °C. When needed, frozen embedded larvae were cut into 20 μm thick sections using a cryostat, mounted on Superfrost slides and stored at -20 °C until immunostaining. For gephyrin, larvae were not fixed, but transferred in 15% sucrose for 1 h at room temperature, anesthetized with 0.01% tricaine and embedded in 7.5% gelatin/15% sucrose. 20- μm -thick sections were post-fixed for 10 min with 4% formaldehyde and treated with 0.25% trypsin diluted in PBS for 2 min. Immunostaining was performed as follows. Sections were washed three times with PBS, blocked and permeabilized with 0.2% gelatin/0.25% Triton diluted in PBS. Rabbit antibody anti-PSD-95 (Abcam, Ab18258, 1:200), an excitatory post-synaptic protein, or rabbit antibody anti-gephyrin (Abcam, Ab185993, 1:100), an inhibitory post-synaptic protein, were added onto the sections, which were incubated overnight at room temperature. Sections were washed several times and incubated with anti-rabbit IgG Alexa 488 conjugated antibody (Molecular Probes, A-21206, 1:500), in the dark at room temperature. After 1 h incubation, sections were washed and stained in the dark for 10 min with 0.3% DAPI. After a last wash, sections were mounted in Fluoromount medium and conserved at 4 °C in the dark. Sections were imaged using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 40x/oil 1.3 objective. Optic tectum and telencephalon regions were captured at full resolution, $0.063 \times 0.063 \times 0.4 \mu\text{m}$ voxel size. Images were deconvoluted using AutoQuant (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) software and processed using ImageJ software. PSD-95 and gephyrin puncta were quantified using a semi-automated macro (Zsolt Csaba; Inserm UMR1141), which applied a threshold to segment the image and select only the puncta ranging between $0.018 \mu\text{m}^2$ and $3.14 \mu\text{m}^2$. The total number of PSD-95 or gephyrin puncta was finally divided by the surface area of interest to obtain the density of PSD-95 and gephyrin signal in the optic tectum. All manual cell counts were performed blind.

2.7. Identification and Counting of Inhibitory and Excitatory Neurons

3, 4 and 5 dpf larvae were anesthetized using 0.01% tricaine and embedded in 1.2% low-melting agarose, ventral-side down, in a recording chamber covered with E3 medium containing 0.003% PTU and 0.01% tricaine. The chamber was then placed under a Zeiss LSM 880 laser scanning confocal microscope equipped with a WPApo 20x/1.0 objective. 52 slices spanning approximately 100 μm were captured and processed using AutoQuant 3.1X (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Gad1b and Vglut2a positive neurons in the optic tectum were counted using Imaris MeasurementPro8.4.2

(Bitplane, Zurich, Switzerland). Briefly, neurons were approximated as 7- μ m-diameter spheres and sorted by their fluorescence intensity.

2.8. Neuronal Death

Neuronal death was detected in living zebrafish brains using acridine orange (AO), which binds to free nucleic acid. 4 dpf control and *scn1Lab* larvae were incubated for 20 min with 10 μ M AO (VectaCell) in E3 medium. Larvae were washed several times, paralyzed with 300 μ M PB and embedded in 1.1% low-melting agarose in the center of a 35 mm glass-bottom dish, covered with E3 medium containing 0.003% PTU and 300 μ M PB. 100 μ m brain stacks were acquired using a Leica SP8 laser confocal scanning microscope equipped with a 20x/multi-immersion 0.75 objective. In addition, 4 dpf control and morphant brains were dissected, fixed with 4% formaldehyde and stained with activated caspase-3 antibody. The brains were first washed with 0.1% triton in PBS, then permeabilized and blocked with 5% goat serum/1% Triton in PBS. Rabbit polyclonal antibody to activated caspase-3 (Abcam, Ab44976, 1:500) was added, which was incubated overnight at room temperature. Brains were washed several times and incubated with an anti-rabbit IgG Alexa 488 conjugated antibody (Molecular Probes, A-21206 1:500), for 1 h at room temperature in the dark. Brains were finally washed, embedded in 1.1% agarose in the center of a 35 mm glass-bottom dish and imaged using a Leica SP8 laser scanning confocal microscope equipped with a 20x/multi-immersion 0.75 objective. All images were processed using AutoQuant 3.1X (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) and ImageJ software.

2.9. Colocalization of Activated Caspase-3 Labeling with Inhibitory or Excitatory Neurons

4 dpf Tg[Gad1:GFP; Vglut2a:DsRed] larval brains were stained using activated caspase-3 antibody followed by anti-rabbit IgG Cy5 conjugated antibody (Molecular Probes, A-10523,1:300) and imaged as previously described. Images were processed using AutoQuant 3.1X (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Colocalization of activated caspase-3 signals with Gad1b or Vglut2a positive neurons was assessed manually using ImageJ software.

2.10. Z-VAD Treatment

3 dpf control and *scn1Lab* larvae were incubated for 24 h with either vehicle or 300 μ M Z-VAD-fmk (Sigma), in E3 medium containing 1% dimethyl sulfoxide (DMSO). Dead cells were then labeled using AO and imaged as previously described.

2.11. Statistics

Data were plotted and analyzed using GraphPad Prism 5. Data were checked for normality using the d'Agostino and Pearson omnibus normality test with alpha set at 0.05. Data that did not follow a normal distribution were compared with a Mann-Whitney test. Data that followed a normal distribution were analyzed with Student's two-tailed unpaired *t*-test with or without Welch's correction depending on the variance difference of each sample. Graphs show the mean and the SEM.

3. Results

3.1. Calcium Imaging Combined with LFP Recordings as Tools to Analyze Neuronal Activity in Vivo in *Scn1Lab*-Depleted Zebrafish Larvae

As previously described, zebrafish embryos injected with 1 pmol *scn1Lab*^{AUG} morpholino-oligonucleotide, hereafter referred to as *scn1Lab* morphants, and *scn1Lab*^{552/s552} mutants displayed several highly penetrant phenotypes, including black appearance resulting from defective pigment aggregation, failure to inflate their swim bladder, and, from 4 dpf onward, recurrent spontaneous epileptiform seizures, reflected by a markedly increased swimming activity of the larvae [8,10], (Figure S1). Importantly, since phenotypes observed in *scn1Lab* morphants (*N* = 904), and particularly seizure number and intensity, were the same as those seen in *scn1Lab*^{552/s552} mutants

($N = 192$), we decided to use the former to further characterize the neuronal phenotypes associated with loss of *Scn1Lab* function.

First, to confirm that the increased swimming activity observed in 4 dpf *scn1Lab* morphants did correspond to bona fide epileptic seizures caused by the synchronous hyperexcitation of large neuron populations, we generated zebrafish *scn1Lab* morphants that also carried the Tg[HuC:GCaMP5G] transgene encoding a calcium-dependent fluorescent protein expressed under the control of the pan-neuronal HuC promoter [16]. To record transient calcium uptakes associated with neuron hyperexcitation during epileptiform seizures, we imaged the optic tectum of pancuronium-paralyzed and agarose-immobilized 4 dpf larvae and simultaneously recorded forebrain local field potentials (LFPs) (Figure 1A). Results show that *scn1Lab*^{AUG} morphants displayed recurrent spontaneous transient calcium uptake events, events with $\Delta F/F_0 > 0.04$, (Figure 1E, F; $p < 0.001$) that also precisely corresponded to multi-spike ictal-like discharges (correlation coefficient $R^2 = 0.772$) (Figure 1G,H), which were never seen in either non-injected larvae or control morphants (Figure 1D) (Figure S2). Thus, in good agreement with previous results [8,10], 4 dpf *Scn1Lab*-depleted zebrafish larvae displayed epileptiform seizures, which could be detected in vivo by both calcium imaging techniques and LFP recordings.

3.2. Inhibitory/Excitatory Synaptic Balance is Disrupted in *Scn1Lab*-Depleted Larvae

Harmonious functioning of neuron networks relies on a finely tuned balance between excitatory and inhibitory inputs [17]. Synapses, which are essential components of this balance, comprise both excitatory and inhibitory subunits that release glutamate and GABA, respectively [18]. This balance is impaired in neurological disorders such as epilepsy in which large populations of neurons display synchronous hyperexcitation [19,20]. We recently showed that zebrafish *gabra1*^{-/-} and *depdc5*^{-/-} epileptic mutants displayed markedly fewer inhibitory synapses compared to age-matched control larvae, showing that these two mutants display brain development defects [21,22]. To determine whether *Scn1Lab* deficiency also induced unbalanced excitatory/inhibitory post-synaptic outputs, we analyzed and compared, by immunocytochemistry, the distribution of the two post-synaptic populations on brain sections of 5 dpf control and *Scn1Lab*-depleted larvae, using anti-PSD-95 and anti-gephyrin antibodies, which label excitatory and inhibitory post-synaptic terminals, respectively [23]. Quantification of the two post-synaptic populations showed a marked increase in PSD-95 labeling (Figure 2B,C; $p < 0.01$) combined with a clear decrease of that of gephyrin (Figure 1E,F; $p < 0.01$), in *scn1Lab*^{AUG} morphants, compared to controls (Figure 2A,D). These data clearly show that depletion of *Scn1Lab* causes a marked disruption of the synaptic balance, which is shifted toward excitation (Figure 2G; $p < 0.01$).

3.3. Distribution of Excitatory and Inhibitory Neurons in *scn1Lab* Model

We next assessed whether the defective excitatory/inhibitory synaptic balance seen in *Scn1Lab*-depleted larvae could be related to an abnormal ratio of inhibitory and excitatory neurons. To test this hypothesis, we used the double transgenic line Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] that labels inhibitory neurons with GFP and excitatory neurons with DsRed [24,25] as recipient line to generate *scn1Lab*^{AUG} morphants (Figure 3). First, live imaging combined with quantitative image analysis revealed that the total number of neurons is significantly decreased in *scn1Lab*^{AUG} morphants at 3 dpf (Figure 3D; $p < 0.05$), 4 dpf (Figure 3G; $p < 0.001$) and 5 dpf (Figure 3J; $p < 0.01$) when compared to age-matched controls. Next, we quantified the number of inhibitory (GFP⁺) and excitatory (DsRed⁺) neurons at 3, 4 and 5 dpf in *scn1Lab*^{AUG} morphants and controls. Our results show that at 3 dpf, the percentage of excitatory and inhibitory neurons was similar in *Scn1Lab*-depleted and control larvae (Figure 3K). By contrast, the ratio of excitatory to inhibitory neurons was markedly increased at 4 dpf (Figure 3L; $p < 0.001$) and 5 dpf (Figure 3M; $p < 0.01$). It is of note that the ratio of excitatory to inhibitory neurons did not change in control embryos between 3 and 5 dpf (Figure 3K,L,M).

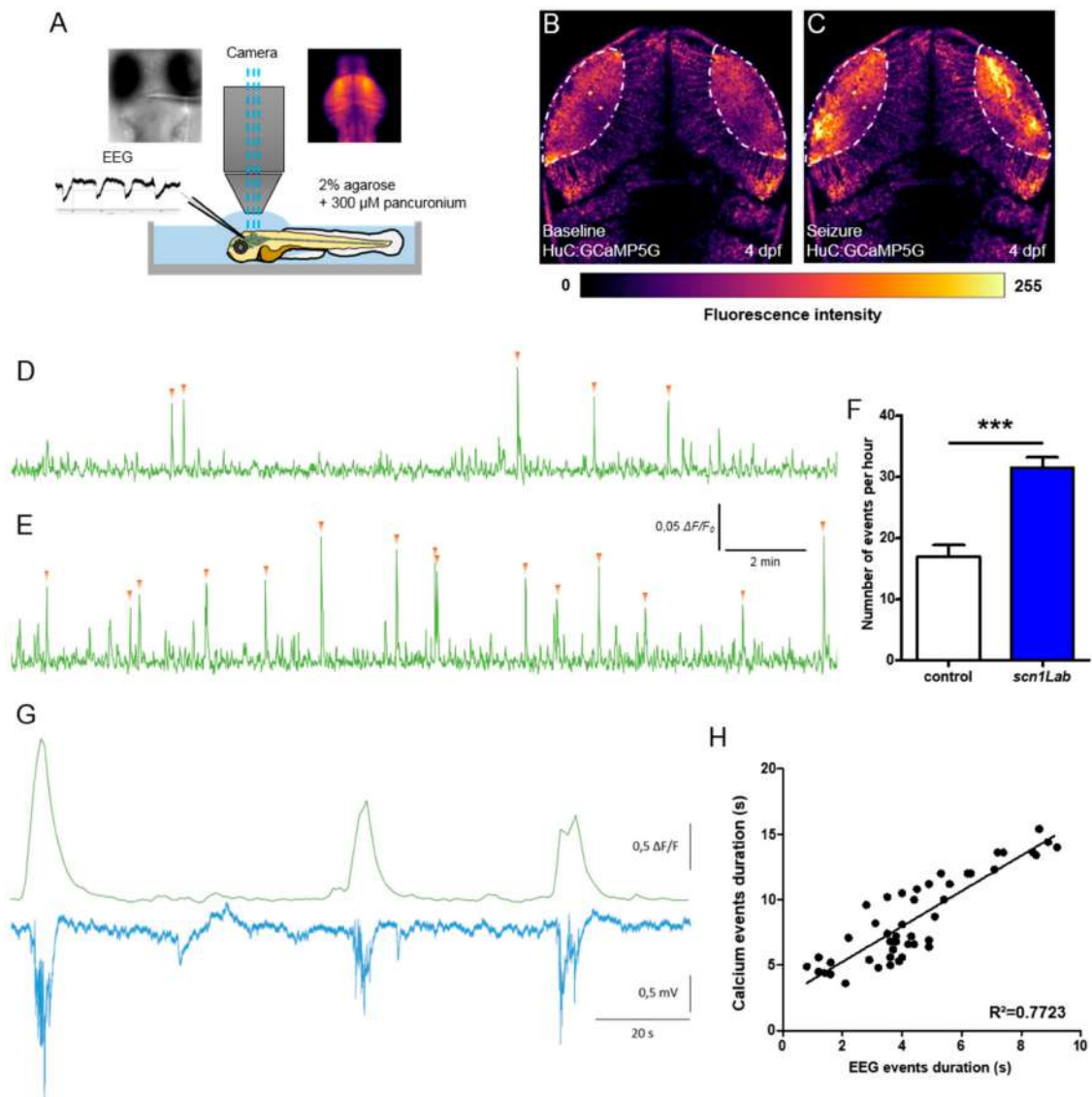


Figure 1. Correlation between LFP and calcium activity in *scn1Lab* model. (A) Schematic of the experimental setup to simultaneously record local field potential and calcium activity of a larval zebrafish brain. (B,C) Calcium images showing respectively the baseline activity (B) and the seizure activity (C). The fluorescence intensity is color-coded as shown in the color bar below the images. (D,E) Representative 20 min calcium recording of immobilized and paralyzed 4 dpf control (D) ($N = 9$) and *scn1Lab* (E) ($N = 9$) larvae. Each calcium event is shown with an orange arrowhead. (F) Number of events, calcium increases greater than $0.04 \Delta F/F_0$ amplitude, during 1 h recording. (G) Representative LFP, recorded in the left neuropil of the optic tectum, and calcium traces, from the optic tectum, of a paralyzed and immobilized 4 dpf *scn1Lab* larva. (H) Correlation between LFP and calcium events duration ($n = 46$). $N =$ number of larvae and $n =$ number of events. Error bars on all graphs represent standard error of the mean (SEM). ***, $p < 0.001$. p -value was determined using Student's unpaired t -test.

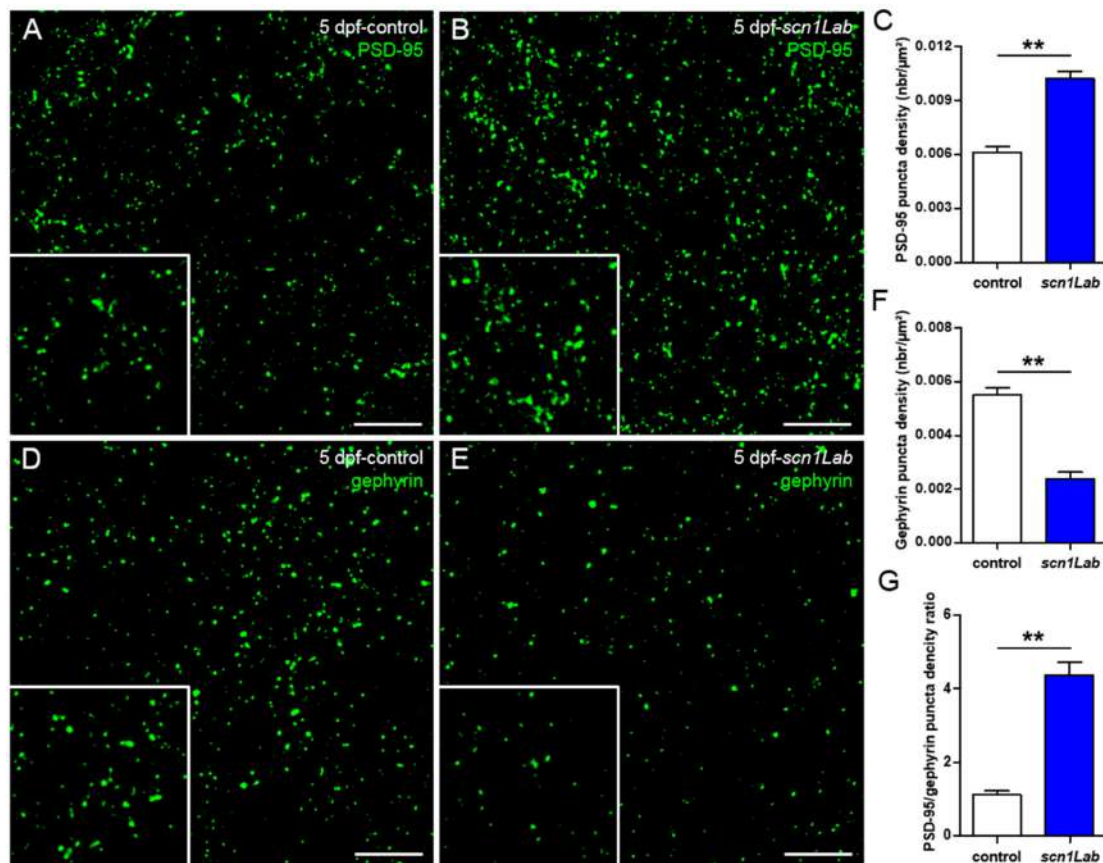


Figure 2. Defects of excitatory/inhibitory balance in the *Scn1Lab*-depleted larvae. (A,B) 20 μm coronal sections of 5 dpf control (A) ($N = 5$, $n = 15$) and *scn1Lab* (B) ($N = 5$, $n = 15$) larvae stained with PSD-95, an excitatory post-synaptic scaffolding protein. (D,E) 20 μm coronal sections of 5 dpf control (D) ($N = 5$, $n = 20$) and *scn1Lab* (E) ($N = 5$, $n = 19$) larvae stained with gephyrin, an inhibitory post-synaptic scaffolding protein. Images were acquired with a SP8 Leica laser scanning confocal microscope equipped with a 40x/oil 1.3 objective. Scale bar 5 μm. (C,F) Quantification of PSD-95 (C) and gephyrin (F) puncta density. (G) PSD-95/gephyrin puncta density ratio. N = number of larvae and n = number of sections. Error bars on all graphs represent standard error mean (SEM). **, $p < 0.01$. p -values were determined using the Mann-Whitney test.

3.4. Increased Neuron Apoptosis in *Scn1Lab*-Depleted Larvae

A large body of data gained from the analysis of neuronal tissues from human epileptic patients and animal epilepsy models clearly indicates that both brief and prolonged seizures cause neuron death through activation of both apoptosis and autophagy signaling pathways [26–28]. We therefore investigated whether *Scn1Lab* depletion induced increased neuron apoptosis. We first used *in vivo* labeling with acridine orange. Results showed that the number of apoptotic cells was markedly increased in *scn1Lab*^{AUG} morphants compared to control larvae (Figure 4A,B,D; $p < 0.001$). To confirm this result, we also visualized neuron apoptosis using immunocytochemistry and anti-activated caspase-3 antibody. In good agreement with acridine orange staining, a significant increase in the number of activated caspase-3 positive cells were observed in the brain of *Scn1Lab*-depleted individuals compared to control larvae (Figure 4E,F,G; $p < 0.001$).

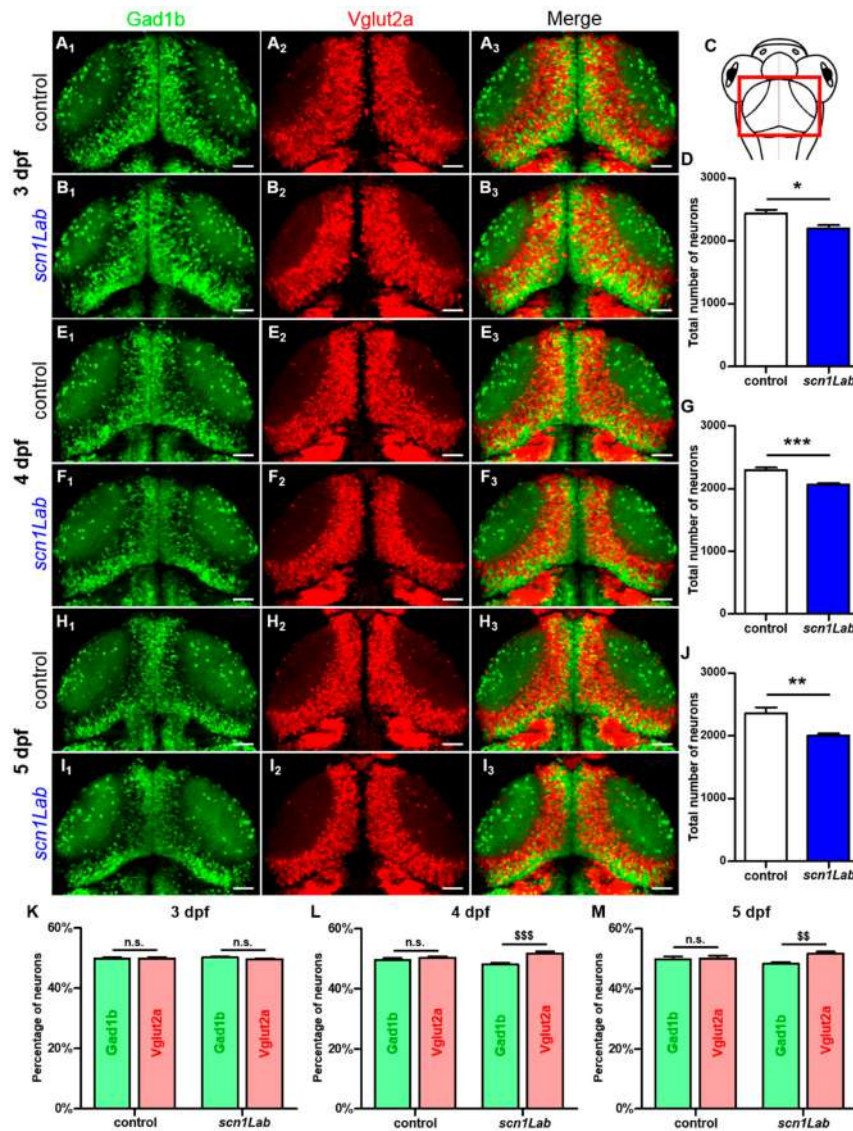


Figure 3. Evolution of the excitatory-inhibitory neuronal population in the *scn1Lab* model. (**A**₁₋₃, **B**₁₋₃) Dorsal view of 3 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (**A**₁₋₃) ($N = 8$) and *scn1Lab* (**B**₁₋₃) ($N = 8$) living larvae. (**A**₁, **B**₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in 3 dpf control (**A**₁) and *scn1Lab* (**B**₁) larvae. (**A**₂, **B**₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in 3 dpf control (**A**₂) and *scn1Lab* (**B**₂) larvae. (**A**₃, **B**₃) Merged image of 3 dpf control (**A**₃) and *scn1Lab* (**B**₃) larvae. (**C**) Dorsal view schematic of a 4 dpf larva. The red rectangle shows the region of interest. (**E**₁₋₃, **F**₁₋₃) Dorsal view of 4 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (**E**₁₋₃) ($N = 8$) and *scn1Lab* (**F**₁₋₃) ($N = 8$) living larvae. (**E**₁, **F**₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in 4 dpf control (**E**₁) and *scn1Lab* (**F**₁) larvae. (**E**₂, **F**₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in 4 dpf control (**E**₂) and *scn1Lab* (**F**₂) larvae. (**E**₃, **F**₃) Merged image of 4 dpf control (**E**₃) and *scn1Lab* (**F**₃) larvae. (**H**₁₋₃, **I**₁₋₃) Dorsal view of 5 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control (**H**₁₋₃) ($N = 8$) and *scn1Lab* (**I**₁₋₃) ($N = 8$) living larvae. (**H**₁, **I**₁) Inhibitory neurons (Gad1b:GFP) in 5 dpf control (**H**₁) and *scn1Lab* (**I**₁) larvae. (**H**₂, **I**₂) Excitatory neurons (Vglut2a:DsRed) in 5 dpf control (**H**₂) and *scn1Lab* (**I**₂) larvae. (**H**₃, **I**₃) Merged image of 5 dpf control (**H**₃) and *scn1Lab* (**I**₃) larvae. (**D**, **G**, **J**) Number of neurons in control and *scn1Lab* larvae at 3 dpf (**D**), 4 dpf (**G**) and 5 dpf (**J**). (**K**, **L**, **M**) Number of inhibitory and excitatory neurons in control and *scn1Lab* larvae at 3 dpf (**K**), 4 dpf (**L**) and 5 dpf (**M**). All images are representative 20 μm stacks acquired using LSM 880 Zeiss laser scanning confocal microscope equipped with a WPApo 20x/1.0 objective. Scale bar 40 μm . $N =$ number of embryos. Error bars on all graphs represent standard error mean (SEM). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ indicate a statistically significant difference between control and *scn1Lab* larvae. Statistically significant difference between inhibitory and excitatory neuronal population is indicated as \$\$, $p < 0.01$; \$\$\$, $p < 0.001$. p -values were determined using Student's unpaired t -test.

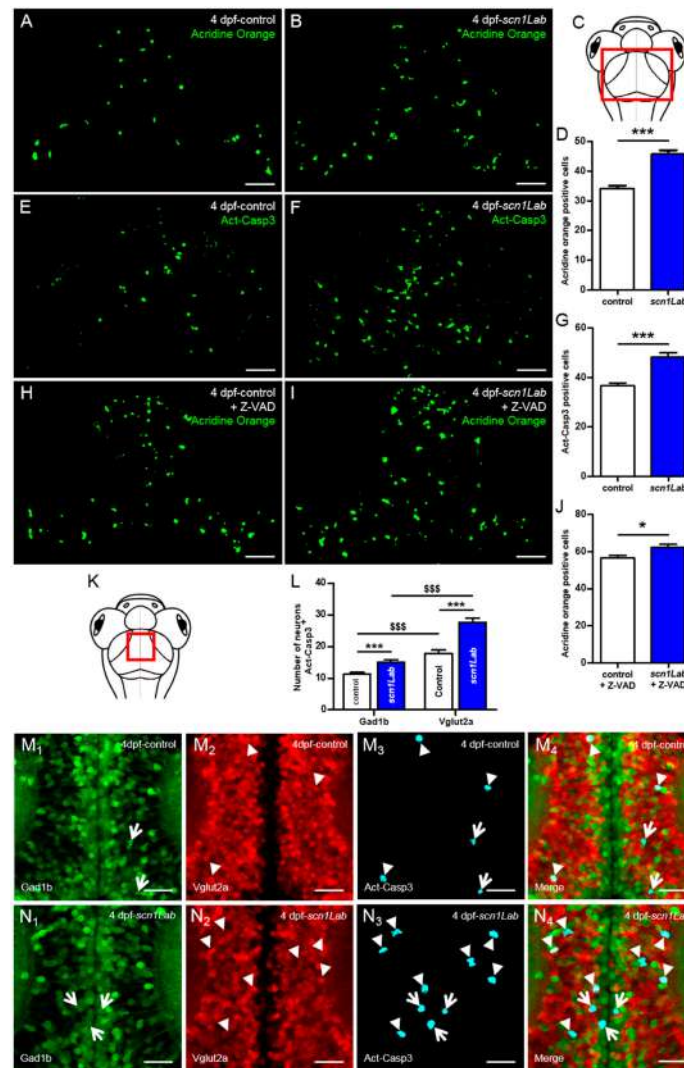


Figure 4. Increased neuronal death in *Scn1Lab*-depleted larvae. (A,B) Dorsal view of 4 dpf living control (A) ($N = 15$) and *scn1Lab* (B) ($N = 15$) larvae stained with acridine orange; 100 μm stack. Scale bar 40 μm . (C) Dorsal view schematic of 4 dpf larva. The red rectangle shows the region of interest for global cell death quantification. (D) Number of acridine orange-positive cells in 4 dpf brain. (E,F) Dorsal view of 4 dpf control (E) ($N = 24$) and *scn1Lab* (F) ($N = 22$) brain stained with activated caspase-3 antibody; 100 μm stack. Scale bar 40 μm . (G) Number of activated caspase-3-positive cells in 4 dpf brain. (H-I) Dorsal view of 4 dpf Z-VAD-treated control (H) ($N = 18$) and *scn1Lab* (I) ($N = 16$) larvae stained with acridine orange; 100 μm stack. Scale bar 40 μm . (J) Number of acridine orange-positive cells in 4 dpf brain. (K) Dorsal view schematic of 4 dpf larva. The red rectangle shows the region of interest for activated caspase-3 signal colocalization with inhibitory and excitatory neurons quantification. (L) Number of inhibitory (*Gad1b*:GFP) and excitatory (*Vglut2a*:DsRed) neurons also showing activated caspase-3 labelling in control and *scn1Lab* larvae. (M₁₋₄, N₁₋₄) Dorsal view of 4 dpf Tg[*Gad1b*:GFP; *Vglut2a*:DsRed] control (M₁₋₄) ($N = 14$) and *scn1Lab* (N₁₋₄) ($N = 14$) brain stained with activated caspase-3 antibody; representative 15 μm stack. Scale bar 10 μm . (M₁,N₁) Inhibitory neurons (*Gad1b*:GFP) in control (M₁) and *scn1Lab* (N₁) larvae. (M₂,N₂) Excitatory neurons (*Vglut2a*:DsRed) in control (M₂) and *scn1Lab* (N₂) larvae. (M₃,N₃) Activated caspase-3 staining in control (M₃) and *scn1Lab* (N₃) larvae. (M₄,N₄) Merged images of control (M₄) and *scn1Lab* (N₄) larvae. Excitatory neurons with activated caspase-3 expression are shown by arrowheads, while inhibitory neurons with activated caspase-3 expression are shown by arrows. Images were all acquired with an SP8 Leica laser scanning confocal microscope equipped with 40x/water 1.1 objective. N = number of embryos. Error bars on all graphs represent standard error mean (SEM). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ indicate a statistically significant difference between control and *scn1Lab* larvae. A statistically significant difference between inhibitory and excitatory neuronal population is indicated as \$\$\$, $p < 0.001$. p -values were determined using Student's unpaired t -test.

Because *Scn1Lab*-depleted larvae showed an increased number of apoptotic cells, we next investigated whether this apoptosis was caspase-dependent. To test this hypothesis, we used Z-VAD, a cell-permeable caspase inhibitor that reversibly binds to the catalytic site of caspase proteases and inhibits their activity [29]. We incubated 3 dpf *Scn1Lab*-depleted and control embryos for 24 h in E3 medium containing 300 μ M Z-VAD and 1% DMSO [30–32]. As negative control, age-matched *Scn1Lab*-depleted and control larvae were incubated for 24 h in E3 medium containing 1% DMSO. Cell death was assessed using acridine orange staining combined with real-time confocal imaging. Our data show that following Z-VAD treatment, the number of acridine orange-positive cells increased in both control (Figure 4A,H) and *Scn1Lab*-depleted larvae (Figure 4B,I), suggesting that Z-VAD had no effect on cell apoptosis in *scn1Lab* model.

We next examined whether apoptotic death occurred in excitatory or inhibitory neurons. To do this, 4 dpf Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed], *Scn1Lab*-depleted and Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] control larvae were fixed and analyzed by immunohistochemistry using anti-activated caspase-3 antibody. In both *Scn1Lab*-depleted (Figure 4N₁₋₄) and control (Figure 4M₁₋₄) Tg[Gad1b:GFP; Vglut2a:DsRed] larvae, we observed a greater number of excitatory neurons expressing activated caspase-3 than inhibitory ones. Quantification of the number of inhibitory and excitatory neurons colocalizing with activated caspase-3 expression, confirmed that neuronal death specifically affects excitatory neurons (Figure 4L; Gad1b⁺-Act-Casp3⁺ vs Vglut2a⁺-Act-Casp3⁺ controls: $p < 0.001$; Gad1b⁺-Act-Casp3⁺ vs Vglut2a⁺-Act-Casp3⁺ *scn1Lab*: $p < 0.001$).

4. Discussion

Dravet syndrome (DS) is a catastrophic childhood epilepsy with multiple comorbidities, which include severe intellectual disability, impaired social development, persistent drug-resistant seizures and high risk of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) [1,33]. In recent years, thanks to vertebrate genome conservation, full genome sequencing and readily available molecular tools and techniques, zebrafish has become a powerful and versatile animal model for studying genetic forms of epilepsy and also to screen for novel anti-epileptic drugs [8,10,22]. Among epilepsy mutants, zebrafish larvae with loss of function of the *scn1Lab* gene, one of the two zebrafish orthologs of *SCN1A*, was instrumental to identify drugs alleviating seizures in refractory epilepsy [8,10]. However, despite the large number of studies that have used *Scn1Lab*-depleted zebrafish mutants and morphants, the neuronal phenotypes induced by loss of function of this sodium channel encoding gene have not yet been fully investigated.

Using combined in vivo calcium imaging and local field potential (LFP) in the optic tectum of zebrafish models of DS, we observed a full correlation between calcium activity and neuronal activity, with both techniques consistently showing generalized ictal-like seizure events. Recent studies showed a correlation between calcium and local field potential activities using an acute PTZ seizure model in zebrafish [14]. To our knowledge, this is the first time that a correlation between calcium and electrical activities has been reported in a genetic model of epilepsy. This finding is important for research on epilepsy because it validates the use of calcium activity to monitor the dynamics of seizures at the scale of an entire vertebrate brain. In particular, calcium imaging provides a unique opportunity to follow the dynamics of seizures spatiotemporally, from the initiation site to propagation through the brain.

We focused on excitatory and inhibitory synapses by studying two important proteins that are markers of synaptic integrity, PSD-95 and gephyrin [23]. PSD-95, by its PDZ domains, serves as a scaffolding protein with a docking site for signaling proteins clustering around NMDA- and AMPA-type glutamate receptors, which are crucial for excitatory neurotransmission and synaptic plasticity [34]. Gephyrin is a core scaffolding protein, the postsynaptic component of inhibitory synapses, and it controls the formation and plasticity of inhibitory synapses through regulation of GABAA and glycine receptors [35]. In the present study, we demonstrated that levels of PSD-95 and gephyrin are modified in zebrafish models of DS. Indeed, by studying the distribution of excitatory and inhibitory neurons during development, we have shown that at 3 days of development, the ratio of excitatory to inhibitory

neurons was comparable between *Scn1Lab*-depleted larvae and their sibling controls. Interestingly, from 4 days of development onward, we observed that the proportion of excitatory neurons increased when compared to that of inhibitory neurons in *scn1Lab*^{AUG} morphants, while this ratio remained unchanged in control embryos. This specific neuronal death may therefore explain the severe gephyrin signal loss observed in the *scn1Lab* model. Moreover, the increase in excitatory neurons detected from 4 dpf onward probably corresponds to the beginning of the disease in *Scn1Lab*-depleted larvae. Interestingly, these data are in good agreement with our results obtained using LFP recording and calcium imaging, showing that the peak of seizures was observable at 4 and 5 dpf in *Scn1Lab*-depleted larvae [8].

Previous studies have shown that subtle changes in synaptic structure or composition, which alter synaptic plasticity and functional responses, most likely contribute to synaptic dysfunction [36]. Differences in key synaptic protein levels can provide information about the excitatory/inhibitory components of neurotransmission that might be disturbed or impaired during epileptogenesis [37]. It is known that the balance between excitatory and inhibitory synapses is impaired in patients with epilepsy [20]. These results are also in line with the observation of Stief et al. (2007) in another model of epilepsy in rats, that the balance between excitatory and inhibitory synapses is shifted toward an over-excited state [19].

Our results using a zebrafish model of DS show an increase in apoptotic cells as previously observed in models of epilepsy [26–28]. We have also shown that treatment of *Scn1Lab*-depleted larvae with Z-VAD fails to inhibit cell death, suggesting that Z-VAD has no effects on cell apoptosis in *scn1Lab* model. However, we cannot exclude the possibility that Z-VAD may cause cellular toxicity in *scn1lab* model thus masking its protective effect. Unexpectedly, colocalization analysis of inhibitory and excitatory neurons with activated caspase-3 staining at 4 dpf revealed that cell death preferentially targeted excitatory neurons. This could be explained by the fact that during seizures, excitatory neurons are hyper-excited and eventually die. In relation to this hypothesis, we sometimes observed during in vivo calcium imaging, using larvae from transgenic line Tg[*HuC:GCaMP5G; scn1Lab*], that some neurons became hyper-excited, as revealed by the over-expression of GFP labeling, and die (personal observations).

Our study emphasizes that the DS models are not only a powerful new tool for finding new antiepileptic drug candidates that could alleviate refractory seizures [8–10], but more importantly, they also display neurodevelopmental alterations characteristic of epileptic brains, such as the imbalance of excitatory/inhibitory synapses and apoptosis. Our data thus provide in vivo evidence for a developmental aspect of epileptogenesis that had been hypothesized [38,39], but not definitely proved. Our study shows that DS is a disease of the central nervous system, and it calls for a closer focus on neurodevelopmental defects leading to severe comorbidities in DS (speech deficiency, autism, etc.) and not just on managing refractory seizures with antiepileptic drugs. More research is needed to understand the exact neurodevelopmental abnormalities causing epilepsy and to correct them as early as possible, rather than only treating them symptomatically at later stages. In the same way, we showed previously that *gabra1* loss of function (generalized epilepsy) induced developmental alterations, in particular for the establishment of GABAergic networks throughout the brain [22].

The findings reported here shed light on the neurobiological changes that occur in the early stages of DS, and are a promising start in understanding the neurodevelopmental origins of DS and finding potential treatments to restore normal brain development at earlier stages of the disease.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1199/s1>, Figure S1: Comparison of *scn1Lab*^{AUG} morphant and *scn1Labs552/s552* mutant morphology and locomotor activity, and <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1199/s2>, Figure S2: Neuronal activity of *scn1Lab* model.

Author Contributions: N.S.-Y. and A.B., conceived and planned the experiments. A.B., performed the analysis, and designed the figures. R.H.-A., and J.S., contributed to the analysis of the results. C.Y., was involved in the planning and the reviewing of the manuscript. N.S.-Y., supervised the findings of this work, wrote and refined the article.

Funding: This work was supported by Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS), the French National Research Agency (ANR-16-CE18-0010), and Fondation NRJ (Institut de France) to NSY. Funding sources had no involvement in study design, collection, analysis or interpretation of data, or decision to publish.

Acknowledgments: We also thank Christiane Romain (Inserm UMR 1141), Olivier Bar (Inserm UMR 1141), and Solène Renault (Inserm UMR 1141) for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Dravet, C. Dravet syndrome history. *Dev. Med. Child Neurol.* **2011**, *53*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nolan, K.J.; Camfield, C.S.; Camfield, P.R. Coping with Dravet syndrome: Parental experiences with a catastrophic epilepsy. *Dev. Med. Child Neurol.* **2006**, *48*, 761–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ohno, Y. Scn1a missense mutation causes limbic hyperexcitability and vulnerability to experimental febrile seizures. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *41*, 261–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Obata, K. Synaptic inhibition and γ -aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2013**, *89*, 139–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ablain, J.; Zon, L.I. Of fish and men: Using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 584–586. [[CrossRef](#)]
6. Grone, B.P.; Baraban, S.C. Animal models in epilepsy research: Legacies and new directions. *Nat. Neurosci.* **2015**, *18*, 339–343. [[CrossRef](#)]
7. Sourbron, J.; Partoens, M.; Scheldeman, C.; Zhang, Y.; Lagae, L.; Witte, P. Drug repurposing for Dravet syndrome in *scn1Lab^{-/-}* mutant zebrafish. *Epilepsia* **2019**, *60*, e8–e13. [[CrossRef](#)]
8. Baraban, S.C.; Dinday, M.T.; Hortopan, G.A. Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2410. [[CrossRef](#)]
9. Dinday, M.T.; Baraban, S.C. Large-Scale Phenotype-Based Antiepileptic Drug Screening in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *eNeuro* **2015**, *2*. [[CrossRef](#)]
10. Zhang, Y. Pharmacological Characterization of an Antisense Knockdown Zebrafish Model of Dravet Syndrome: Inhibition of Epileptic Seizures by the Serotonin Agonist Fenfluramine. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125898. [[CrossRef](#)]
11. Grone, B.P.; Qu, T.; Baraban, S.C. Behavioral Comorbidities and Drug Treatments in a Zebrafish *scn1lab* Model of Dravet Syndrome. *eNeuro*. **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Griffin, A.; Hamling, K.R.; Knupp, K.; Hong, S.; Lee, L.P.; Baraban, S.C. Clemizole and modulators of serotonin signalling suppress seizures in Dravet syndrome. *Brain* **2017**, *140*, 669–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kumar, M.G.; Rowley, S.; Fulton, R.; Dinday, M.T.; Baraban, S.C.; Patel, M. Altered Glycolysis and Mitochondrial Respiration in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome. *eNeuro* **2016**, *3*, 1–12. [[CrossRef](#)]
14. Liu, J.; Baraban, S.C. Network Properties Revealed during Multi-Scale Calcium Imaging of Seizure Activity in Zebrafish. *eNeuro* **2019**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Sourbron, J. Serotonergic Modulation as Effective Treatment for Dravet Syndrome in a Zebrafish Mutant Model. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 588–598. [[CrossRef](#)]
16. Akerboom, J. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 13819–13840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Turrigiano, G.G.; Nelson, S.B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 97–107. [[CrossRef](#)]
18. Kantamneni, S. Cross-talk and regulation between glutamate and GABA_B receptors. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 135. [[CrossRef](#)]
19. Stief, F.; Zuschratter, W.; Hartmann, K.; Schmitz, D.; Draguhn, A. Enhanced synaptic excitation-inhibition ratio in hippocampal interneurons of rats with temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 519–528. [[CrossRef](#)]
20. Eichler, S.A. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2848–2866. [[CrossRef](#)]
21. Swaminathan, A. Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 1924–1937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Samarut, É. γ -Aminobutyric acid receptor alpha 1 subunit loss of function causes genetic generalized epilepsy by impairing inhibitory network neurodevelopment. *Epilepsia* **2018**, *59*, 2061–2074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Yan, Q.; Zhai, L.; Zhang, B.; Dallman, J.E. Spatial patterning of excitatory and inhibitory neuropil territories during spinal circuit development. *J. Comp. Neurol.* **2017**, *525*, 1649–1667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Satou, C.; Kimura, Y.; Higashijima, S.I. Generation of Multiple Classes of V0 Neurons in Zebrafish Spinal Cord: Progenitor Heterogeneity and Temporal Control of Neuronal Diversity. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 1771–1783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Satou, C.; Kimura, Y.; Hirata, H.; Suster, M.L.; Kawakami, K.; Higashijima, S.I. Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* **2013**, *140*, 3927–3931. [[CrossRef](#)]
26. Li, Q. Alterations of apoptosis and autophagy in developing brain of rats with epilepsy: Changes in LC3, P62, Beclin-1 and Bcl-2 levels. *Neurosci. Res.* **2018**, *130*, 47–55. [[CrossRef](#)]
27. Kotloski, R.; Lynch, M.; Lauersdorf, S.; Sutula, T. Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog. Brain Res.* **2002**, *2*, 95–110.
28. Henshall, D.; Murphy, B. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 75–81. [[CrossRef](#)]
29. Callus, B.A.; Vaux, D.L. Caspase inhibitors: Viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 73–78. [[CrossRef](#)]
30. Dong, W. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol. Sci.* **2002**, *69*, 191–201. [[CrossRef](#)]
31. Gregory-Evans, C.Y.; Moosajee, M.; Shan, X.; Gregory-Evans, K. Gene-specific differential response to anti-apoptotic therapies in zebrafish models of ocular Coloboma. *Mol. Vis.* **2011**, *17*, 1473–1484. [[PubMed](#)]
32. Williams, J.A.; Holder, N. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear. Res.* **2000**, *143*, 171–181. [[CrossRef](#)]
33. Le Gal, F. A case of SUDEP in a patient with Dravet syndrome with SCN1A mutation. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1915–1918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sheng, M. Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7058–7061. [[CrossRef](#)]
35. Pizzarelli, R. Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions. *Neuroscience* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. He, H.; Shen, W.; Zheng, L.; Guo, X.; Cline, H.T. Excitatory synaptic dysfunction cell-autonomously decreases inhibitory inputs and disrupts structural and functional plasticity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2893. [[CrossRef](#)]
37. Bonansco, C.; Fuenzalida, M. Plasticity of Hippocampal Excitatory-Inhibitory Balance: Missing the Synaptic Control in the Epileptic Brain. *Neural Plast.* **2016**, *2016*, 1–13. [[CrossRef](#)]
38. Tanaka, M.; DeLorey, T.M.; Delgado-Escueta, A.; Olsen, R.W. GABRB3, Epilepsy, and Neurodevelopment. In *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]*, 4th ed.; Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Eds.; National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA, 2012.
39. Bozzi, Y.; Casarosa, S.; Caleo, M. Epilepsy as a Neurodevelopmental Disorder. *Front. Psychiatry* **2012**, *3*, 19. [[CrossRef](#)]



Bibliographie

- de Abreu, Murilo S., Rafael Genario, Ana C. V. V. Giacomini, Konstantin A. Demin, Anton M. Lakstygai, Tamara G. Amstislavskaya, Barbara Dotto Fontana, Matthew O. Parker, and Allan V. Kalueff. 2020. "Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders." *Neuroscience* 445:3–11.
- Afrikanova, Tatiana, Ann Sophie K. Serruys, Olivia E. M. Buenafe, Ralph Clinckers, Ilse Smolders, Peter A. M. de Witte, Alexander D. Crawford, and Camila V. Esguerra. 2013. "Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs." *PLoS ONE* 8(1). doi: 10.1371/journal.pone.0054166.
- Ahrens, Misha B., Michael B. Orger, Drew N. Robson, Jennifer M. Li, and Philipp J. Keller. 2013. "Whole-Brain Functional Imaging at Cellular Resolution Using Light-Sheet Microscopy." *Nature Methods* 10:5 10(5):413–20. doi: 10.1038/nmeth.2434.
- Ali, Shaukat, Danielle L. Champagne, Herman P. Spaink, and Michael K. Richardson. 2011. "Zebrafish Embryos and Larvae: A New Generation of Disease Models and Drug Screens." *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 93(2):115–33. doi: 10.1002/BDRC.20206.
- Allen, Nicola J., and David A. Lyons. 2018. "Glia as Architects of Central Nervous System Formation and Function." *Science* 362(6411):181–85.
- Amitai, Gabi, Rachel Adani, Eliezer Fishbein, Haim Meshulam, Ido Laish, and Shlomit Dachir. 2005. "Bifunctional Compounds Eliciting Anti-Inflammatory and Anti-Cholinesterase Activity as Potential Treatment of Nerve and Blister Chemical Agents Poisoning." *Chemico-Biological Interactions* 157–158:361–62. doi: 10.1016/J.CBI.2005.10.051.
- Andoh, Megumi, Yuji Ikegaya, and Ryuta Koyama. 2019. "Synaptic Pruning by Microglia in Epilepsy." *Journal of Clinical Medicine* 8(12):2170. doi: 10.3390/jcm8122170.
- Antinucci, Paride, and Robert Hindges. 2016. "A Crystal-Clear Zebrafish for in Vivo Imaging." *Scientific Reports* 2016 6:1 6(1):1–10. doi: 10.1038/srep29490.
- Araki, Tasuku, Yuji Ikegaya, and Ryuta Koyama. 2020. "The Effects of Microglia- and Astrocyte-Derived Factors on Neurogenesis in Health and Disease." *European Journal of Neuroscience*.
- Askew, Katharine, Kaizhen Li, Adrian Olmos-Alonso, Fernando Garcia-Moreno, Yajie Liang, Philippa Richardson, Tom Tipton, Mark A. Chapman, Kristoffer Riecken, Sol Beccari, Amanda Sierra, Zoltán Molnár, Mark S. Cragg, Olga Garaschuk, V. Hugh Perry, and Diego Gomez-Nicola. 2017. "Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain." *Cell Reports* 18(2):391–405. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.041.
- Atwood, Donald, and Claire Paisley-Jones. 2017. *Pesticides Industry Sales and Usage: 2008-2012 Market Estimates*. Washington, DC.
- Bachstetter, Adam D., Josh M. Morganti, Jennifer Jernberg, Andrea Schlunk, Staten H. Mitchell, Kaelin W. Brewster, Charles E. Hudson, Michael J. Cole, Jeffrey K. Harrison, Paula C. Bickford, and Carmelina Gemma. 2011. "Fractalkine and CX3CR1 Regulate

- Hippocampal Neurogenesis in Adult and Aged Rats.” *Neurobiology of Aging* 32(11):2030–44. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.11.022.
- Badimon, Ana, Hayley J. Strasburger, Pinar Ayata, Xinhong Chen, Aditya Nair, Ako Ikegami, Philip Hwang, Andrew T. Chan, Steven M. Graves, Joseph O. Uweru, Carola Ledderose, Munir Gunes Kutlu, Michael A. Wheeler, Anat Kahan, Masago Ishikawa, Ying Chih Wang, Yong Hwee E. Loh, Jean X. Jiang, D. James Surmeier, Simon C. Robson, Wolfgang G. Junger, Robert Sebra, Erin S. Calipari, Paul J. Kenny, Ukpong B. Eyo, Marco Colonna, Francisco J. Quintana, Hiroaki Wake, Viviana Gradinaru, and Anne Schaefer. 2020. “Negative Feedback Control of Neuronal Activity by Microglia.” *Nature* 586(7829):417–23. doi: 10.1038/s41586-020-2777-8.
- Bajracharya, S. R., P. N. Prasad, and R. Ghimire. 2016. “Management of Organophosphorus Poisoning.” *Journal of Nepal Health Research Council* 14(34):131–38.
- Balali-Mood, M., K. Balali-Mood, M. Moodi, and B. Balali-Mood. 2012. *Health Aspects of Organophosphorous Pesticides in Asian Countries*. Vol. 41.
- Balali-Mood, Mahdi, Beeta Balali-Mood, and Kia Balali-Mood. 2016. “Nerve Agents.” Pp. 1–28 in *Critical Care Toxicology*, edited by J. Brent, K. Burkhart, P. Dargan, B. Hatten, B. Megarbane, and R. Palmer. Cham: Springer International Publishing.
- Balali-Mood, Mahdi, and Hamidreza Saber. 2012. “Recent Advances in the Treatment of Organophosphorous Poisonings.” *Iran Journal of Medical Sciences* 37(2):74–91.
- Banks, Christopher N., and Pamela J. Lein. 2012. “A Review of Experimental Evidence Linking Neurotoxic Organophosphorus Compounds and Inflammation.” *NeuroToxicology* 33(3):575–84. doi: 10.1016/J.NEURO.2012.02.002.
- Baraban, S. C., M. R. Taylor, P. A. Castro, and H. Baier. 2005. “Pentylentetrazole Induced Changes in Zebrafish Behavior, Neural Activity and c-Fos Expression.” *Neuroscience* 131(3):759–68. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.11.031.
- Baraban, Scott C., Matthew T. Dinday, and Gabriela A. Hortopan. 2013. “Drug Screening in Scn1a Zebrafish Mutant Identifies Clemizole as a Potential Dravet Syndrome Treatment.” *Nature Communications* 4. doi: 10.1038/NCOMMS3410.
- von Bartheld, Christopher S., Jami Bahney, and Suzana Herculano-Houzel. 2016. “The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A Review of 150 Years of Cell Counting.” *Journal of Comparative Neurology* 524(18):3865–95.
- Baulac, Stéphanie, Gilles Huberfeld, Isabelle Gourfinkel-An, Georgia Mitropoulou, Alexandre Beranger, Jean François Prud’homme, Michel Baulac, Alexis Brice, Roberto Bruzzone, and Eric LeGuern. 2001. “First Genetic Evidence of GABAA Receptor Dysfunction in Epilepsy: A Mutation in the $\Gamma 2$ -Subunit Gene.” *Nature Genetics* 28(1):46–48. doi: 10.1038/ng0501-46.
- Bedell, Victoria M., Stephanie E. Westcot, and Stephen C. Ekker. 2011. “Lessons from Morpholino-Based Screening in Zebrafish.” *Briefings in Functional Genomics* 10(4):181–88. doi: 10.1093/BFGP/ELR021.
- Belgrad, Jillian, Dipankar J. Dutta, Samantha Bromley-Coolidge, Kimberly A. Kelly, Lindsay T. Michalovicz, Kimberly A. Sullivan, James P. O’Callaghan, and Richard. Douglas Fields. 2019. “Oligodendrocyte Involvement in Gulf War Illness.” *Glia* 67(11):2107. doi: 10.1002/GLIA.23668.

- Bennion, Brian J., Sebnem G. Essiz, Edmond Y. Lau, Jean Luc Fattebert, Aiyana Emigh, and Felice C. Lightstone. 2015. "A Wrench in the Works of Human Acetylcholinesterase: Soman Induced Conformational Changes Revealed by Molecular Dynamics Simulations" edited by F. Salsbury, Jr. *PLoS ONE* 10(4):e0121092. doi: 10.1371/journal.pone.0121092.
- Berry, WK, and DR Davies. 1966. "Factors Influencing the Rate of 'Aging' of a Series of Alkyl Methylphosphonyl-Acetylcholinesterases." *Biochemical Journal* 100(2):572–76. doi: 10.1042/BJ1000572.
- Bertran, Françoise. 2018. "Epilepsy Today." *Revue de l'Infirmiere* 67(243):14–16. doi: 10.1016/j.revinf.2018.07.003.
- Bidri, Mohamed, Bernard Royer, Geneviève Averlant, Georges Bismuth, Jean Jacques Guillosson, and Michel Arock. 1999. "Inhibition of Mouse Mast Cell Proliferation and Proinflammatory Mediator Release by Benzodiazepines." *Immunopharmacology* 43(1):75–86. doi: 10.1016/S0162-3109(99)00046-6.
- Blasko, Imrich, Michaela Stampfer-Kountchev, Peter Robatscher, Robert Veerhuis, Piet Eikelenboom, and Beatrix Grubeck-Loebenstein. 2004. "How Chronic Inflammation Can Affect the Brain and Support the Development of Alzheimer's Disease in Old Age: The Role of Microglia and Astrocytes." *Aging Cell* 3(4):169–76. doi: 10.1111/J.1474-9728.2004.00101.X.
- Bond, Simon T., Kevin A. McEwen, Prusothman Yoganantharajah, and Yann Gibert. 2018. "Live Metabolic Profile Analysis of Zebrafish Embryos Using a Seahorse XF 24 Extracellular Flux Analyzer." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1797:393–401. doi: 10.1007/978-1-4939-7883-0_21.
- Bouchard, Maryse F., David C. Bellinger, Robert O. Wright, and Marc G. Weisskopf. 2010. "Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Urinary Metabolites of Organophosphate Pesticides." *Pediatrics* 125:1270–77. doi: 10.1542/peds.2009-3058.
- Brenet, Alexandre, Rahma Hassan-Abdi, Julie Somkhit, Constantin Yanicostas, and Nadia Soussi-Yanicostas. 2019. "Defective Excitatory/Inhibitory Synaptic Balance and Increased Neuron Apoptosis in a Zebrafish Model of Dravet Syndrome." *Cells* 8(10):1199. doi: 10.3390/cells8101199.
- Brenet, Alexandre, Julie Somkhit, Rahma Hassan-Abdi, Constantin Yanicostas, Christiane Romain, Olivier Bar, Alexandre Igert, Dominique Saurat, Nicolas Taudon, Gregory Dal-Bo, Florian Nachon, Nina Dupuis, and Nadia Soussi-Yanicostas. 2020. "Organophosphorus Diisopropylfluorophosphate (DFP) Intoxication in Zebrafish Larvae Causes Behavioral Defects, Neuronal Hyperexcitation and Neuronal Death." *Scientific Reports*. doi: 10.1101/2019.12.15.876649.
- Buffat, J. J., J. P. Bonsignour, I. Ricordel, and Y. Diraison. 1989. "Toxicité Des 'Gaz' de Combat." Pp. 67–91 in *La réanimation respiratoire préhospitalière*, edited by JEPU. Paris: Arnette.
- Bullitt, E. 1990. "Expression of C-Fos-like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 296(4):517–30. doi: 10.1002/CNE.902960402.
- Castranova, Daniel, Bakary Samasa, Marina Venero Galanternik, Hyun Min Jung, Van N. Pham, and Brant M. Weinstein. 2021. "Live Imaging of Intracranial Lymphatics in the

- Zebrafish.” *Circulation Research* 128(1):42–58. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317372.
- Chen, Xiang-Ke, Joseph Shiu-Kwong Kwan, Raymond Chuen-Chung Chang, Alvin Chun-Hang Ma, and Alvin Chun. 2021. “1-Phenyl 2-Thiourea (PTU) Activates Autophagy in Zebrafish Embryos.” *Autophagy* 17(5):1222–31. doi: 10.1080/15548627.2020.1755119.
- Cho, Sung Joon, Eugene Park, Tamar Telliyan, Andrew Baker, and Aylin Y. Reid. 2020. “Zebrafish Model of Posttraumatic Epilepsy.” *Epilepsia* 61(8):1774–85. doi: 10.1111/EPI.16589.
- Chrétien, F., A. V. Vallat-Decouvelaere, C. Bossuet, A. C. Rimaniol, R. Le Grand, G. Le Pavec, C. Créminon, D. Dormont, F. Gray, and G. Gras. 2002. “Expression of Excitatory Amino Acid Transporter-2 (EAAT-2) and Glutamine Synthetase (GS) in Brain Macrophages and Microglia of SIVmac251-Infected Macaques.” *Neuropathology and Applied Neurobiology* 28(5):410–17. doi: 10.1046/J.1365-2990.2002.00426.X.
- Christou, Maria, Arturas Kavaliauskis, Erik Ropstad, and Thomas William Kenneth Fraser. 2020. “DMSO Effects Larval Zebrafish (*Danio Rerio*) Behavior, with Additive and Interaction Effects When Combined with Positive Controls.” *Science of The Total Environment* 709:134490. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2019.134490.
- Chung, Leeyup. 2015. “A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal.” *Development & Reproduction* 19(2):61. doi: 10.12717/DR.2015.19.2.061.
- Claes, Lieve, Jurgen Del-Favero, Bertien Ceulemans, Lieven Lagae, Christine Van Broeckhoven, and Peter De Jonghe. 2001. “De Novo Mutations in the Sodium-Channel Gene SCN1A Cause Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy.” *The American Journal of Human Genetics* 68(6):1327–32. doi: 10.1086/320609.
- Collombet, Jean Marc, Daniel Béracochéa, Pierrette Liscia, Christophe Piérard, Guy Lallement, and Pierre Filliat. 2011. “Long-Term Effects of Cytokine Treatment on Cognitive Behavioral Recovery and Neuronal Regeneration in Soman-Poisoned Mice.” *Behavioural Brain Research* 221(1):261–70. doi: 10.1016/J.BBR.2011.03.006.
- Cong, Lin, Zeguan Wang, Yuming Chai, Wei Hang, Chunfeng Shang, Wenbin Yang, Lu Bai, Jiulin Du, Kai Wang, and Quan Wen. 2017. “Rapid Whole Brain Imaging of Neural Activity in Freely Behaving Larval Zebrafish (*Danio Rerio*).” *ELife* 6. doi: 10.7554/eLife.28158.
- Coolen, Marion, and Laure Bally-Cuif. 2008. “A MicroRNA as a Gatekeeper of the Midbrain-Hindbrain Boundary.” *Médecine/Sciences* 24(10):787–89. doi: 10.1051/medsci/20082410787.
- Costa, Lucio G. 2018. “Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues.” *Toxicological Sciences* 162(1):24–35. doi: 10.1093/toxsci/kfx266.
- Cowan, Fred M., C. A. Broomfield, D. E. Lenz, and W. J. Smith. 2003. “Putative Role of Proteolysis and Inflammatory Response in the Toxicity of Nerve and Blister Chemical Warfare Agents: Implications for Multi-Threat Medical Countermeasures.” *Journal of Applied Toxicology* 23(3):177–86. doi: 10.1002/JAT.901.
- Crone, Hugh D. 1974. “Can Allosteric Effectors of Acetylcholinesterase Control the Rate of Ageing of the Phosphorylated Enzyme?” *Biochemical Pharmacology* 23(2):460–63. doi: 10.1016/0006-2952(74)90439-0.

- Crouch, Barry, Linda Sommerlade, Peter Veselcic, Gernot Riedel, Björn Schelter, and Bettina Platt. 2018. "Detection of Time-, Frequency- and Direction-Resolved Communication within Brain Networks." *Scientific Reports* 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-19707-1.
- Curado, Silvia, Didier YR Stainier, and Ryan M. Anderson. 2008. "Nitroreductase-Mediated Cell/Tissue Ablation in Zebrafish: A Spatially and Temporally Controlled Ablation Method with Applications in Developmental and Regeneration Studies." *Nature Protocols* 3(6):948–54. doi: 10.1038/NPROT.2008.58.
- D'Agati, Gianluca, Rosanna Beltre, Anna Sessa, Alexa Burger, Yi Zhou, Christian Mosimann, and Richard M. White. 2017. "A Defect in the Mitochondrial Protein Mpv17 Underlies the Transparent Casper Zebrafish." *Developmental Biology* 430(1):11–17. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.07.017.
- Dai, Xu Ming, Gregory R. Ryan, Andrew J. Hapel, Melissa G. Dominguez, Robert G. Russell, Sara Kapp, Vonetta Sylvestre, and E. Richard Stanley. 2002. "Targeted Disruption of the Mouse Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Gene Results in Osteopetrosis, Mononuclear Phagocyte Deficiency, Increased Primitive Progenitor Cell Frequencies, and Reproductive Defects." *Blood* 99(1):111–20. doi: 10.1182/blood.V99.1.111.
- Delfino, Reinaldo T., Tatiana S. Ribeiro, and José D. Figueroa-Villar. 2009. "Organophosphorus Compounds as Chemical Warfare Agents: A Review." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20(3):407–28. doi: 10.1590/S0103-50532009000300003.
- Devinsky, Orrin, Annamaria Vezzani, Souhel Najjar, Nihal C. De Lanerolle, and Michael A. Rogawski. 2013. "Glia and Epilepsy: Excitability and Inflammation." *Trends in Neurosciences* 36(3):174–84.
- Dombeck, Daniel A., Anton N. Khabbaz, Forrest Collman, Thomas L. Adelman, and David W. Tank. 2007. "Imaging Large-Scale Neural Activity with Cellular Resolution in Awake, Mobile Mice." *Neuron* 56(1):43–57. doi: 10.1016/J.NEURON.2007.08.003.
- Van Dongen, Cornelia J., Ronald M. Elskamp, and Leo P. A. De Jong. 1987. "Influence of Atropine upon Reactivation and Ageing of Rat and Human Erythrocyte Acetylcholinesterase Inhibited by Soman." *Biochemical Pharmacology* 36(7):1167–69. doi: 10.1016/0006-2952(87)90428-X.
- Draper, Bruce W., Paul A. Morcos, and Charles B. Kimmel. 2001. "Inhibition of Zebrafish Fgf8 Pre-mRNA Splicing with Morpholino Oligos: A Quantifiable Method for Gene Knockdown." *Genesis* 30(3):154–56. doi: 10.1002/GENE.1053.
- Dravet, Charlotte. 2011. "Dravet Syndrome History." *Developmental Medicine and Child Neurology* 53 Suppl 2(SUPPL. 2):1–6. doi: 10.1111/J.1469-8749.2011.03964.X.
- Dubrana, Leslie E., Anja Knoll-Gellida, Laure M. Bourcier, Théo Mercé, Sandra Pedemay, Florian Nachon, André-Guilhem Calas, Rachid Baati, Magalie Soares, and Patrick J. Babin. 2021. "An Antidote Screening System for Organophosphorus Poisoning Using Zebrafish Larvae." *ACS Chemical Neuroscience* .1c00251. doi: 10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00251.
- Eddleston, M., P. Eyer, F. Worek, M. H. Rezvi Sheriff, and N. A. Buckley. 2008. "Predicting Outcome Using Butyrylcholinesterase Activity in Organophosphorus Pesticide Self-Poisoning." *QJM* 101(6):467–74. doi: 10.1093/qjmed/hcn026.
- Ekker, Marc. 2021. "Visualizing Traumatic Brain Injuries." *ELife* 10:1–3. doi:

10.7554/ELIFE.65676.

- Eyo, Ukpong B., Jiyun Peng, Przemyslaw Swiatkowski, Aparna Mukherjee, Ashley Bispo, and Long Jun Wu. 2014. "Neuronal Hyperactivity Recruits Microglial Processes via Neuronal NMDA Receptors and Microglial P2Y₁₂ Receptors after Status Epilepticus." *Journal of Neuroscience* 34(32):10528–40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0416-14.2014.
- Faria, Melissa, Natàlia Garcia-Reyero, Francesc Padrós, Patrick J. Babin, David Sebastián, Jérôme Cachot, Eva Prats, Mark Arick II, Eduardo Rial, Anja Knoll-Gellida, Guilaine Mathieu, Florane Le Bihanic, B. Lynn Escalon, Antonio Zorzano, Amadeu M. V. ... Soares, and Demetrio Raldúa. 2015. "Zebrafish Models for Human Acute Organophosphorus Poisoning." *Scientific Reports* 5:15591. doi: 10.1038/srep15591.
- Farkhondeh, Tahereh, Omid Mehrpour, Fatemeh Forouzanfar, Babak Roshanravan, and Saeed Samarghandian. 2020. "Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Organophosphate Pesticide-Induced Neurotoxicity and Its Amelioration: A Review." *Environmental Science and Pollution Research International* 27(20):24799–814. doi: 10.1007/S11356-020-09045-Z.
- Felix, R., M. G. Cecchini, W. Hofstetter, P. R. Elford, A. Stutzer, and H. Fleisch. 1990. "Impairment of Macrophage Colony-stimulating Factor Production and Lack of Resident Bone Marrow Macrophages in the Osteopetrotic Op/Op Mouse." *Journal of Bone and Mineral Research* 5(7):781–89. doi: 10.1002/jbmr.5650050716.
- Ferrero, Giuliano, Etienne Gomez, Sowmya Iyer, Mireia Rovira, Magali Miserocchi, David M. Langenau, Julien Y. Bertrand, and Valérie Wittamer. 2020. "The Macrophage-Expressed Gene (Mpeg) 1 Identifies a Subpopulation of B Cells in the Adult Zebrafish." *Journal of Leukocyte Biology* 107(3):431–43. doi: 10.1002/JLB.1A1119-223R.
- Ferrero, Giuliano, Christopher B. Mahony, Eléonore Dupuis, Laurent Yvernogeu, Elodie Di Ruggiero, Magali Miserocchi, Marianne Caron, Catherine Robin, David Traver, Julien Y. Bertrand, and Valérie Wittamer. 2018. "Embryonic Microglia Derive from Primitive Macrophages and Are Replaced by Cmyb-Dependent Definitive Microglia in Zebrafish." *Cell Reports* 24(1):130–41. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.066.
- Ferrero, Giuliano, Magali Miserocchi, Elodie Di Ruggiero, and Valérie Wittamer. 2021. "A Csf1rb Mutation Uncouples Two Waves of Microglia Development in Zebrafish." *Development (Cambridge, England)* 148(1). doi: 10.1242/dev.194241.
- Fisher, Robert S., Carlos Acevedo, Alexis Arzimanoglou, Alicia Bogacz, J. Helen Cross, Christian E. Elger, Jerome Engel, Lars Forsgren, Jacqueline A. French, Mike Glynn, Dale C. Hesdorffer, B. I. Lee, Gary W. Mathern, Solomon L. Moshé, Emilio Perucca, Ingrid E. Scheffer, Torbjörn Tomson, Masako Watanabe, and Samuel Wiebe. 2014. "ILAE Official Report: A Practical Clinical Definition of Epilepsy." *Epilepsia* 55(4):475–82. doi: 10.1111/epi.12550.
- Fisher, Robert S., J. Helen Cross, Jacqueline A. French, Norimichi Higurashi, Edouard Hirsch, Floor E. Jansen, Lieven Lagae, Solomon L. Moshé, Jukka Peltola, Eliane Roulet Perez, Ingrid E. Scheffer, and Sameer M. Zuberi. 2017. "Operational Classification of Seizure Types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology." *Epilepsia* 58(4):522–30. doi: 10.1111/EPI.13670.
- Fleming, Angeleen, Heike Diekmann, and Paul Goldsmith. 2013. "Functional Characterisation

- of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish.” *PLOS ONE* 8(10). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0077548.
- Flynn, Sean, and M. Ali Babi. 2016. “Anticonvulsants.” Pp. 176–92 in *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition*. Elsevier.
- Frade, José María, and Yves Alain Barde. 1998. “Microglia-Derived Nerve Growth Factor Causes Cell Death in the Developing Retina.” *Neuron* 20(1):35–41. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80432-8.
- Franjesevic, Andrew J., Sydney B. Sillart, Jeremy M. Beck, Shubham Vyas, Christopher S. Callam, and Christopher M. Hadad. 2019. “Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase.” *Chemistry – A European Journal* 25(21):5337–71. doi: 10.1002/CHEM.201805075.
- Füger, Petra, Jasmin K. Hefendehl, Karthik Veeraraghavalu, Ann-Christin Wendeln, Christine Schlosser, Ulrike Obermüller, Bettina M. Wegenast-Braun, Jonas J. Neher, Peter Martus, Shinichi Kohsaka, Martin Thunemann, Robert Feil, Sangram S. Sisodia, Angelos Skodras, and Mathias Jucker. 2017. “Microglia Turnover with Aging and in an Alzheimer’s Model via Long-Term in Vivo Single-Cell Imaging.” *Nature Neuroscience* 20(10):1371–76. doi: 10.1038/NN.4631.
- Galic, Michael A., Kiarash Riazi, and Quentin J. Pittman. 2012. “Cytokines and Brain Excitability.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 33(1):116–25.
- Garaschuk, Olga, and Alexei Verkhratsky. 2019. “Physiology of Microglia.” Pp. 27–40 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2034. Humana Press Inc.
- Gawel, Kinga, Melanie Langlois, Teresa Martins, Wietske van der Ent, Ettore Tiraboschi, Maxime Jacmin, Alexander D. Crawford, and Camila V. Esguerra. 2020. “Seizing the Moment: Zebrafish Epilepsy Models.” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 116:1–20. doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2020.06.010.
- Gibson, Erin M., David Purger, Christopher W. Mount, Andrea K. Goldstein, Grant L. Lin, Lauren S. Wood, Ingrid Inema, Sarah E. Miller, Gregor Bieri, J. Bradley Zuchero, Ben A. Barres, Pamelyn J. Woo, Hannes Vogel, and Michelle Monje. 2014. “Neuronal Activity Promotes Oligodendrogenesis and Adaptive Myelination in the Mammalian Brain.” *Science* 344(6183). doi: 10.1126/SCIENCE.1252304.
- Gilbert, Matthew J. H., Tanja C. Zerulla, and Keith B. Tierney. 2014. “Zebrafish (Danio Rerio) as a Model for the Study of Aging and Exercise: Physical Ability and Trainability Decrease with Age.” *Experimental Gerontology* 50(1):106–13. doi: 10.1016/J.EXGER.2013.11.013.
- Ginhoux, Florent, Melanie Greter, Marylene Leboeuf, Sayan Nandi, Peter See, Solen Gokhan, Mark F. Mehler, Simon J. Conway, Lai Guan Ng, E. Richard Stanley, Igor M. Samokhvalov, and Miriam Merad. 2010. “Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages.” *Science* 330(6005):841–45. doi: 10.1126/science.1194637.
- Ginhoux, Florent, and Marco Prinz. 2015. “Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(8). doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
- Giulian, D. 1987. “Ameboid Microglia as Effectors of Inflammation in the Central Nervous

- System.” *Journal of Neuroscience Research* 18(1):155–71. doi: 10.1002/JNR.490180123.
- Glasauer, Stella M. K., and Stephan C. F. Neuhaus. 2014. “Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes and Its Evolutionary Consequences.” *Molecular Genetics and Genomics* 289(6):1045–60.
- Gosselin, David, Dylan Skola, Nicole G. Coufal, Inge R. Holtman, Johannes C. M. Schlachetzki, Eniko Sajti, Baptiste N. Jaeger, Carolyn O’Connor, Conor Fitzpatrick, Martina P. Pasillas, Monique Pena, Amy Adair, David D. Gonda, Michael L. Levy, Richard M. Ransohoff, Fred H. Gage, and Christopher K. Glass. 2017. “An Environment-Dependent Transcriptional Network Specifies Human Microglia Identity.” *Science* 356(6344):1248–59. doi: 10.1126/SCIENCE.AAL3222.
- Griffin, A., C. Krasniak, and S. C. Baraban. 2016. “Advancing Epilepsy Treatment through Personalized Genetic Zebrafish Models.” *Progress in Brain Research* 226:195–207. doi: 10.1016/BS.PBR.2016.03.012.
- Griffin, Alisha, Kyla R. Hamling, Soon Gweon Hong, Mana Anvar, Luke P. Lee, and Scott C. Baraban. 2018. “Preclinical Animal Models for Dravet Syndrome: Seizure Phenotypes, Comorbidities and Drug Screening.” *Frontiers in Pharmacology* 9(JUN):573. doi: 10.3389/FPHAR.2018.00573/BIBTEX.
- Griffin, Alisha, Kyla R. Hamling, Kelly Knupp, Soon Gweon Hong, Luke P. Lee, and Scott C. Baraban. 2017. “Clemizole and Modulators of Serotonin Signalling Suppress Seizures in Dravet Syndrome.” *Brain: A Journal of Neurology* 140(3):669–83. doi: 10.1093/BRAIN/AWW342.
- Guignet, Michelle, Kiran Dhakal, Brenna M. Flannery, Brad A. Hobson, Dorota Zolkowska, Ashish Dhir, Donald A. Bruun, Shuyang Li, Abdul Wahab, Danielle J. Harvey, Jill L. Silverman, Michael A. Rogawski, and Pamela J. Lein. 2020. “Persistent Behavior Deficits, Neuroinflammation, and Oxidative Stress in a Rat Model of Acute Organophosphate Intoxication.” *Neurobiology of Disease* 133. doi: 10.1016/J.NBD.2019.03.019.
- Hablitz, Lauren M., Hanna S. Vinitzky, Qian Sun, Frederik Filip Stæger, Björn Sigurdsson, Kristian N. Mortensen, Tuomas O. Lilius, and Maiken Nedergaard. 2019. “Increased Glymphatic Influx Is Correlated with High EEG Delta Power and Low Heart Rate in Mice under Anesthesia.” *Science Advances* 5(2). doi: 10.1126/SCIADV.AAV5447.
- Haddad-Tóvolli, Roberta, Nathalia R. V. Dragano, Albina F. S. Ramalho, and Licio A. Velloso. 2017. “Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control.” *Frontiers in Neuroscience*. doi: 10.3389/FNINS.2017.00224.
- Hagan, Nellwyn, John L. Kane, Deepak Grover, Lisa Woodworth, Charlotte Madore, Jacqueline Saleh, Jose Sancho, Jinyu Liu, Yi Li, Jonathan Proto, Matija Zelic, Amy Mahan, Michael Kothe, Andrew A. Scholte, Maria Fitzgerald, Barbara Gisevius, Aiden Haghikia, Oleg Butovsky, and Dimitry Ofengeim. 2020. “CSF1R Signaling Is a Regulator of Pathogenesis in Progressive MS.” *Cell Death & Disease* 2020 11:10 11(10):1–25. doi: 10.1038/S41419-020-03084-7.
- Hammond, Timothy R., Daisy Robinton, and Beth Stevens. 2018. “Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34:523–44.
- Harding, Luke. 2020. “Navalny Says Russian Officer Admits Putting Poison in Underwear.”

The Guardian.

- Hasselmann, Jonathan, and Mathew Blurton-Jones. 2020. "Human iPSC-Derived Microglia: A Growing Toolset to Study the Brain's Innate Immune Cells." *Glia* 68(4):721–39. doi: 10.1002/GLIA.23781.
- Haynes, Sharon E., Gunther Hollopeter, Guang Yang, Dana Kurpius, Michael E. Dailey, Wen Biao Gan, and David Julius. 2006. "The P2Y12 Receptor Regulates Microglial Activation by Extracellular Nucleotides." *Nature Neuroscience* 9(12):1512–19. doi: 10.1038/nn1805.
- Hedegaard, Anne, Szymon Stodolak, William S. James, and Sally A. Cowley. 2020. "Honing the Double-Edged Sword: Improving Human iPSC-Microglia Models." *Frontiers in Immunology* 11. doi: 10.3389/FIMMU.2020.614972.
- Herbert, Julia, Horst Thiermann, Franz Worek, and Timo Wille. 2019. "COPD and Asthma Therapeutics for Supportive Treatment in Organophosphate Poisoning." *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)* 57(7):644–51. doi: 10.1080/15563650.2018.1540785.
- Herbomel, Philippe, Bernard Thisse, and Christine Thisse. 2001. "Zebrafish Early Macrophages Colonize Cephalic Mesenchyme and Developing Brain, Retina, and Epidermis through a M-CSF Receptor-Dependent Invasive Process." *Developmental Biology* 238(2):274–88. doi: 10.1006/dbio.2001.0393.
- Higashijima, Shin Ichi, Mark A. Masino, Gail Mandel, and Joseph R. Fetcho. 2003. "Imaging Neuronal Activity during Zebrafish Behavior with a Genetically Encoded Calcium Indicator." *Journal of Neurophysiology* 90(6):3986–97. doi: 10.1152/jn.00576.2003.
- Hirbec, Hélène, François Rassendren, and Etienne Audinat. 2019. "Microglia Reactivity: Heterogeneous Pathological Phenotypes." Pp. 41–55 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2034. Humana Press Inc.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, Sean Humphray, Karen McLaren, Lucy Matthews, Stuart McLaren, Ian Sealy, Mario Caccamo, Carol Churcher, Carol Scott, Jeffrey C. Barrett, Romke Koch, Gerd J org Rauch, Simon White, William Chow, Britt Kilian, Leonor T. Quintais, José A. Guerra-Assun o, Yi Zhou, Yong Gu, Jennifer Yen, Jan Hinnerk Vogel, Tina Eyre, Seth Redmond, Ruby Banerjee, Jianxiang Chi, Beiyuan Fu, Elizabeth Langley, Sean F. Maguire, Gavin K. Laird, David Lloyd, Emma Kenyon, Sarah Donaldson, Harminder Sehra, Jeff Almeida-King, Jane Loveland, Stephen Trevanion, Matt Jones, Mike Quail, Dave Willey, Adrienne Hunt, John Burton, Sarah Sims, Kirsten McLay, Bob Plumb, Joy Davis, Chris Clee, Karen Oliver, Richard Clark, Clare Riddle, David Elliott, Glen Threadgold, Glenn Harden, Darren Ware, Beverly Mortimer, Giselle Kerry, Paul Heath, Benjamin Phillimore, Alan Tracey, Nicole Corby, Matthew Dunn, Christopher Johnson, Jonathan Wood, Susan Clark, Sarah Pelan, Guy Griffiths, Michelle Smith, Rebecca Glithero, Philip Howden, Nicholas Barker, Christopher Stevens, Joanna Harley, Karen Holt, Georgios Panagiotidis, Jamieson Lovell, Helen Beasley, Carl Henderson, Daria Gordon, Katherine Auger, Deborah Wright, Joanna Collins, Claire Raisen, Lauren Dyer, Kenric Leung, Lauren Robertson, Kirsty Ambridge, Daniel Leongamornlert, Sarah McGuire, Ruth Gilderthorp, Coline Griffiths, Deepa Manthravadi, Sarah Nichol, Gary Barker, Siobhan Whitehead, Michael Kay, Jacqueline Brown, Clare Murnane, Emma Gray, Matthew Humphries, Neil Sycamore, Darren Barker, David Saunders, Justene Wallis, Anne Babbage, Sian Hammond, Maryam Mashreghi-Mohammadi, Lucy Barr, Sancha Martin, Paul Wray, Andrew Ellington, Nicholas

- Matthews, Matthew Ellwood, Rebecca Woodmansey, Graham Clark, James Cooper, Anthony Tromans, Darren Grafham, Carl Skuce, Richard Pandian, Robert Andrews, Elliot Harrison, Andrew Kimberley, Jane Garnett, Nigel Fosker, Rebekah Hall, Patrick Garner, Daniel Kelly, Christine Bird, Sophie Palmer, Ines Gehring, Andrea Berger, Christopher M. Dooley, Zübeyde Ersan-Ürün, Cigdem Eser, Horst Geiger, Maria Geisler, Lena Karotki, Anette Kirn, Judith Konantz, Martina Konantz, Martina Oberländer, Silke Rudolph-Geiger, Mathias Teucke, Kazutoyo Osoegawa, Baoli Zhu, Amanda Rapp, Sara Widaa, Cordelia Langford, Fengtang Yang, Nigel P. Carter, Jennifer Harrow, Zemin Ning, Javier Herrero, Steve M. J. Searle, Anton Enright, Robert Geisler, Ronald H. A. Plasterk, Charles Lee, Monte Westerfield, Pieter J. De Jong, Leonard I. Zon, John H. Postlethwait, Christiane Nüsslein-Volhard, Tim J. P. Hubbard, Hugues Roest Crolius, Jane Rogers, and Derek L. Stemple. 2013. “The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome.” *Nature* 496(7446):498–503. doi: 10.1038/nature12111.
- Huang, Gang, Pu Zhang, Hideyo Hirai, Shannon Elf, Xiaomei Yan, Zhao Chen, Steffen Koschmieder, Yutaka Okuno, Tajhal Dayaram, Joseph D. Growney, Ramesh A. Shivdasani, D. Gary Gilliland, Nancy A. Speck, Stephen D. Nimer, and Daniel G. Tenen. 2008. “PU.1 Is a Major Downstream Target of AML1 (RUNX1) in Adult Mouse Hematopoiesis.” *Nature Genetics* 40(1):51–60. doi: 10.1038/ng.2007.7.
- Hudson, Andrew E. 2018. “Genetic Reporters of Neuronal Activity: C-Fos and G-CaMP6.” *Methods in Enzymology* 603:197–220. doi: 10.1016/BS.MIE.2018.01.023.
- Ignatius, Myron S., and David M. Langenau. 2011. “Fluorescent Imaging of Cancer in Zebrafish.” Pp. 437–59 in *Methods in Cell Biology*. Vol. 105. Academic Press Inc.
- IUCN. 2021. *Table 1a: Number of Species Evaluated in Relation to the Overall Number of Described Species, and Number of Threatened Species by Major Groups of Organisms*.
- Jacquet, P., L. Poirier, D. Daudé, and E. Chabrière. 2019. “Intoxication Aux Organophosphorés : Vers Des Traitements Enzymatiques.” *Annales Pharmaceutiques Françaises* 77(5):349–62. doi: 10.1016/J.PHARMA.2019.06.002.
- Jensen, Caleb, and Yong Teng. 2020. “Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?” *Frontiers in Molecular Biosciences* 0. doi: 10.3389/FMOLB.2020.00033.
- Jeong, Jae Yeon, Hyouk Bum Kwon, Jong Chan Ahn, Dongmin Kang, Seung Hae Kwon, Jeong Ae Park, and Kyu Won Kim. 2008. “Functional and Developmental Analysis of the Blood–Brain Barrier in Zebrafish.” *Brain Research Bulletin* 75(5):619–28. doi: 10.1016/J.BRAINRESBULL.2007.10.043.
- John, Harald, Marcel J. van der Schans, Marianne Koller, Helma E. T. Spruit, Franz Worek, Horst Thiermann, and Daan Noort. 2018. “Fatal Sarin Poisoning in Syria 2013: Forensic Verification within an International Laboratory Network.” *Forensic Toxicology* 36(1):61–71. doi: 10.1007/S11419-017-0376-7/FIGURES/4.
- Kalász, H., S. M. Nurulain, G. Veress, S. Antus, F. Darvas, E. Adeghate, A. Adem, F. Hashemi, and K. Tekes. 2015. “Mini Review on Blood-Brain Barrier Penetration of Pyridinium Aldoximes.” *Journal of Applied Toxicology : JAT* 35(2):116–23. doi: 10.1002/JAT.3048.
- Karasali, H., and N. Maragou. 2016. “Pesticides and Herbicides: Types of Pesticide.” *Encyclopedia of Food and Health* 319–25. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00535-3.
- Kassa, J. 2002. “Review of Oximes in the Antidotal Treatment of Poisoning by

- Organophosphorus Nerve Agents.” *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* 40(6):803–16.
- Kell, Margaret J., Rachel E. Riccio, Emily A. Baumgartner, Zachary J. Compton, Paul J. Pecorin, Taylor A. Mitchell, Jacek Topczewski, and Elizabeth E. LeClair. 2018. “Targeted Deletion of the Zebrafish Actin-Bundling Protein L-Plastin (Lcp1).” *PLoS ONE* 13(1):e0190353. doi: 10.1371/journal.pone.0190353.
- Kettenmann, Helmut, Uwe-Karsten Hanisch, Mami Noda, and Alexei Verkhratsky. 2011. “Physiology of Microglia.” *Physiological Reviews* 91(2):461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- Kierdorf, Katrin, and Marco Prinz. 2013. “Factors Regulating Microglia Activation.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7(MAR):44.
- Kim, Ji Eun, and Kyung Ok Cho. 2018. “The Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy and EEG Monitoring Using Radiotelemetry System in Mice.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (132). doi: 10.3791/56831.
- Kim, Kyeongnam, and Sung Eun Lee. 2021. “Combined Toxicity of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and Vanadium towards Zebrafish Embryos (*Danio Rerio*): Unexpected Synergistic Effect by DMSO.” *Chemosphere* 270. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.129405.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F. Schilling. 1995. “Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.” *Developmental Dynamics* 203(3):253–310. doi: 10.1002/aja.1002030302.
- Kossack, Michelle E., and Bruce W. Draper. 2019. “Genetic Regulation of Sex Determination and Maintenance in Zebrafish (*Danio Rerio*).” Pp. 119–49 in *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. 134. Academic Press Inc.
- Kyrargyri, Vasiliki, Christian Madry, Ali Rifat, I. Lorena Arancibia-Carcamo, Steffan P. Jones, Victor T. T. Chan, Yajing Xu, Bernard Robaye, and David Attwell. 2020. “P2Y13 Receptors Regulate Microglial Morphology, Surveillance, and Resting Levels of Interleukin 1 β Release.” *GLIA* 68(2):328–44. doi: 10.1002/glia.23719.
- Van Landeghem, Frank K. H., John F. Stover, Ingo Bechmann, Wolfgang Brck, Andreas Unterberg, Christoph Bhrer, and Andreas Von Deimling. 2001. “Early Expression of Glutamate Transporter Proteins in Ramified Microglia after Controlled Cortical Impact Injury in the Rat.” *Glia* 35(3):167–79. doi: 10.1002/GLIA.1082.
- Lauber, Kirsten, Erwin Bohn, Stefan Martin Kröber, Yi Jin Xiao, Sibylle G. Blumenthal, Ralph K. Lindemann, Patrizia Marini, Carolin Wiedig, Anke Zobywalski, Shairaz Baksh, Yan Xu, Ingo B. Autenrieth, Klaus Schulze-Osthoff, Claus Belka, Gernot Stuhler, and Sebastian Wesselborg. 2003. “Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal.” *Cell* 113(6):717–30. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00422-7.
- Leung, Maxwell CK, and Joel N. Meyer. 2019. “Mitochondria as a Target of Organophosphate and Carbamate Pesticides: Revisiting Common Mechanisms of Action with New Approach Methodologies.” *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 89:83–92. doi: 10.1016/J.REPROTOX.2019.07.007.
- Li, Dandan, Yunze Zhang, Haitao Song, Liangqiu Lu, Deli Liu, and Yongze Yuan. 2017.

- “Aminoalcohol-Induced Activation of Organophosphorus Hydrolase (OPH) towards Diisopropylfluorophosphate (DFP).” *PLOS ONE* 12(1). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0169937.
- Li, Dongfang, Pinggan Li, Zhanwen He, Danyang Cen, Zhe Meng, Liyang Liang, and Xiangyang Luo. 2012. “Human Intravenous Immunoglobulins Suppress Seizure Activities and Inhibit the Activation of GFAP-Positive Astrocytes in the Hippocampus of Picrotoxin-Kindled Rats.” *International Journal of Neuroscience* 122(4):200–208. doi: 10.3109/00207454.2011.639470.
- Li, Ying, Xu-fei Du, Chang-sheng Liu, Zi-long Wen, and Jiu-lin Du. 2012. “Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo.” *Developmental Cell* 23(6):1189–1202. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.027.
- Li, Zeran, Devon Ptak, Liyun Zhang, Elwood K. Walls, Wenxuan Zhong, and Yuk Fai Leung. 2012. “Phenylthiourea Specifically Reduces Zebrafish Eye Size.” *PloS One* 7(6). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0040132.
- Liang, Katharine J., Jung Eun Lee, Yunqing D. Wang, Wenxin Ma, Aurora M. Fontainhas, Robert N. Fariss, and Wai T. Wong. 2009. “Regulation of Dynamic Behavior of Retinal Microglia by CX3CR1 Signaling.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50(9):4444–51. doi: 10.1167/iovs.08-3357.
- Liu, Jing, and Scott C. Baraban. 2019. “Network Properties Revealed during Multi-Scale Calcium Imaging of Seizure Activity in Zebrafish.” *ENeuro* 6(1). doi: 10.1523/ENEURO.0041-19.2019.
- Locker, Alicia R., Lindsay T. Michalovicz, Kimberly A. Kelly, Julie V. Miller, Diane B. Miller, and James P. O’Callaghan. 2017. “Corticosterone Primes the Neuroinflammatory Response to Gulf War Illness-relevant Organophosphates Independently of Acetylcholinesterase Inhibition.” *Journal of Neurochemistry* 142(3):444. doi: 10.1111/JNC.14071.
- Lotti, M., A. Moretto, R. Zoppellari, R. Dainese, N. Rizzuto, and G. Barusco. 1986. “Inhibition of Lymphocytic Neuropathy Target Esterase Predicts the Development of Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy.” *Archives of Toxicology* 59(3):176–79. doi: 10.1007/BF00316329.
- Lotti, Marcello. 2010. “Clinical Toxicology of Anticholinesterase Agents in Humans.” Pp. 1543–89 in *Hayes’ Handbook of Pesticide Toxicology*, edited by R. Krieger. San Diego: Academic Press.
- Lue, Lih-Fen, Thomas G. Beach, and Douglas G. Walker. 2019. “Alzheimer’s Disease Research Using Human Microglia.” *Cells* 8(8). doi: 10.3390/CELLS8080838.
- Malfatti, Michael A., Heather A. Enright, Nicholas A. Be, Edward A. Kuhn, Saphon Hok, M. Windy McNerney, Victoria Lao, Tuan H. Nguyen, Felice C. Lightstone, Timothy S. Carpenter, Brian J. Bennion, and Carlos A. Valdez. 2017. “The Biodistribution and Pharmacokinetics of the Oxime Acetylcholinesterase Reactivator RS194B in Guinea Pigs.” *Chemico-Biological Interactions* 277:159–67. doi: 10.1016/J.CBI.2017.09.016.
- Manoharan, Indumathi, Rathnam Boopathy, Sultan Darvesh, and Oksana Lockridge. 2007. “A Medical Health Report on Individuals with Silent Butyrylcholinesterase in the Vysya Community of India.” *Clinica Chimica Acta* 378(1–2):128–35. doi:

- 10.1016/j.cca.2006.11.005.
- Masson, Patrick, and Oksana Lockridge. 2010. "Butyrylcholinesterase for Protection from Organophosphorus Poisons: Catalytic Complexities and Hysteretic Behavior." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 494(2):107–20.
- Masson, Patrick, and Florian Nachon. 2017. "Cholinesterase Reactivators and Bioscavengers for Pre- and Post-Exposure Treatments of Organophosphorus Poisoning." *Journal of Neurochemistry* 142:26–40.
- Maupu, Clémence, Julie Enderlin, Alexandre Igert, Myriam Oger, Stéphane Auvin, Rahma Hassan-Abdi, Nadia Soussi-Yanicostas, Xavier Brazzolotto, Florian Nachon, Grégory Dal Bo, and Nina Dupuis. 2021. "Diisopropylfluorophosphate-Induced Status Epilepticus Drives Complex Glial Cell Phenotypes in Adult Male Mice." *Neurobiology of Disease* 152:105276. doi: 10.1016/J.NBD.2021.105276.
- Mazzolini, Julie, Sigrid Le Clerc, Gregoire Morisse, Cédric Coulonges, Laura E. Kuil, Tjakko J. van Ham, Jean François Zagury, and Dirk Sieger. 2020. "Gene Expression Profiling Reveals a Conserved Microglia Signature in Larval Zebrafish." *GLIA* 68(2):298–315. doi: 10.1002/glia.23717.
- McCurley, Amy T., and Gloria V Callard. 2008. "Characterization of Housekeeping Genes in Zebrafish: Male-Female Differences and Effects of Tissue Type, Developmental Stage and Chemical Treatment." *BMC Molecular Biology* 9(1). doi: 10.1186/1471-2199-9-102.
- McKercher, Scott R., Bruce E. Torbett, Karen L. Anderson, Gregory W. Henkel, Deborah J. Vestal, Helene Baribault, Michael Klemsz, Ann J. Feeney, Gillian E. Wu, Christopher J. Paige, and Richard A. Maki. 1996. "Targeted Disruption of the PU.1 Gene Results in Multiple Hematopoietic Abnormalities." *EMBO Journal* 15(20):5647–58. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00949.x.
- de Medeiros, Magda Alves, Luis Carlos Reis, and Luiz Eugênio Mello. 2005. "Stress-Induced c-Fos Expression Is Differentially Modulated by Dexamethasone, Diazepam and Imipramine." *Neuropsychopharmacology* 2005 30:7 30(7):1246–56. doi: 10.1038/sj.npp.1300694.
- Mew, Emma J., Prianka Padmanathan, Flemming Konradsen, Michael Eddleston, Shu Sen Chang, Michael R. Phillips, and David Gunnell. 2017. "The Global Burden of Fatal Self-Poisoning with Pesticides 2006-15: Systematic Review." *Journal of Affective Disorders* 219(May):93–104. doi: 10.1016/j.jad.2017.05.002.
- Minami, Masabumi, Yasushi Kuraishi, and Masamichi Satoh. 1991. "Effects of Kainic Acid on Messenger RNA Levels of IL-1 β , IL-6, TNF α and LIF in the Rat Brain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176(2):593–98. doi: 10.1016/S0006-291X(05)80225-6.
- Minton, Neil A., and Virginia S. G. Murray. 1988. "A Review of Organophosphate Poisoning." *Medical Toxicology and Adverse Drug Experience* 3(5):350–75.
- Morimoto, Kiyoshi, Takako Murasugi, and Tomiichiro Oda. 2002. "Acute Neuroinflammation Exacerbates Excitotoxicity in Rat Hippocampus in Vivo." *Experimental Neurology* 177(1):95–104. doi: 10.1006/EXNR.2002.7991.
- Moyer, Robert A., Kevin G. McGarry, Michael C. Babin, Gennady E. Platoff, David A. Jett, and David T. Yeung. 2018. "Kinetic Analysis of Oxime-Assisted Reactivation of Human,

- Guinea Pig, and Rat Acetylcholinesterase Inhibited by the Organophosphorus Pesticide Metabolite Phorate Oxon (PHO).” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 145:93–99. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.01.009.
- Mundy, Paige C., Rosalia Mendieta, and Pamela J. Lein. 2021. “Diisopropylfluorophosphate (DFP) Volatizes and Cross-Contaminates Wells in a Common 96-Well Plate Zebrafish Larvae Exposure Method.” *BioRxiv* 2021.07.19.452994. doi: 10.1101/2021.07.19.452994.
- Nardone, Raffaele, Francesco Brigo, and Eugen Trinkla. 2016. “Acute Symptomatic Seizures Caused by Electrolyte Disturbances.” *Journal of Clinical Neurology (Korea)* 12(1):21–33. doi: 10.3988/jcn.2016.12.1.21.
- Naudin, Stéphane. 1996. “Le Développement Embryo-Larvaire Du Danio Zébré (Brachydanio Rerio) : Évaluation de Ce Modèle Pour La Mesure de La Toxicité Des Effluents et Des Sédiments : Apports de l’analyse d’images Pour Les Mesures Biométriques de l’essai Embryo-Larvaire.” Metz.
- Naughton, Sean X., and Alvin V. *. Terry. 2018. “Neurotoxicity in Acute and Repeated Organophosphate Exposure.” doi: 10.1016/j.tox.2018.08.011.
- Nayak, Debasis, Theodore L. Roth, and Dorian B. McGavern. 2014. “Microglia Development and Function.” *Annual Review of Immunology* 32:367–402.
- Newmark, Jonathan. 2009. “Nerve Agents.” Pp. 646–59 in *Clinical Neurotoxicology: Syndromes, Substances, Environments*. Elsevier Inc.
- Nimmerjahn, Axel, Frank Kirchhoff, and Fritjof Helmchen. 2005. “Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo.” *Science* 308(5726):1314–18. doi: 10.1126/science.1110647.
- Noda, Mariko, Yukiko Doi, Jianfeng Liang, Jun Kawanokuchi, Yoshifumi Sonobe, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Mizuno, and Akio Suzumura. 2011. “Fractalkine Attenuates Excito-Neurotoxicity via Microglial Clearance of Damaged Neurons and Antioxidant Enzyme Heme Oxygenase-1 Expression.” *Journal of Biological Chemistry* 286(3):2308–19. doi: 10.1074/jbc.M110.169839.
- Ohno, Susumu. 1970. *Evolution by Gene Duplication*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ojo, Joseph O., Laila Abdullah, James Evans, Jon Mike Reed, Hannah Montague, Michael J. Mullan, and Fiona C. Crawford. 2014. “Exposure to an Organophosphate Pesticide, Individually or in Combination with Other Gulf War Agents, Impairs Synaptic Integrity and Neuronal Differentiation, and Is Accompanied by Subtle Microvascular Injury in a Mouse Model of Gulf War Agent Exposure.” *Neuropathology* 34(2):109–27. doi: 10.1111/NEUP.12061.
- Olson, Marilyn C., Edward W. Scott, Andrew A. Hack, Gloria H. Su, Daniel G. Tenen, Harinder Singh, and M. Celeste Simon. 1995. “PU.1 Is Not Essential for Early Myeloid Gene Expression but Is Required for Terminal Myeloid Differentiation.” *Immunity* 3(6):703–14. doi: 10.1016/1074-7613(95)90060-8.
- Paolicelli, Rosa C., Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Laura Maggi, Maria Scianni, Patrizia Panzanelli, Maurizio Giustetto, Tiago Alves Ferreira, Eva Guiducci, Laura Dumas, Davide Ragozzino, and Cornelius T. Gross. 2011. “Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development.” *Science* 333(6048):1456–58. doi: 10.1126/science.1202529.

- Parent, Jack M., Robert C. Elliott, Samuel J. Pleasure, Nicholas M. Barbaro, and Daniel H. Lowenstein. 2006. "Aberrant Seizure-Induced Neurogenesis in Experimental Temporal Lobe Epilepsy." *Annals of Neurology* 59(1):81–91. doi: 10.1002/ANA.20699.
- Parichy, David M., Michael R. Elizondo, Margaret G. Mills, Tiffany N. Gordon, and Raymond E. Engeszer. 2009. "Normal Table of Postembryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish." *Developmental Dynamics* 238(12):2975–3015. doi: 10.1002/dvdy.22113.
- Peters, Stephen P., and Mark S. Dykewicz. 2020. "Anticholinergic Therapies." Pp. 1547–60 in *Middleton's Allergy: Principles and Practice*, edited by Elsevier.
- Petroianu, G. A. 2009. "The Synthesis of Phosphor Ethers: Who Was Franz Anton Voegeli?" *Pharmazie* 64:269–75. doi: 10.1691/ph.2009.8244.
- Pisharath, Harshan, and Michael J. Parsons. 2009. "Nitroreductase-Mediated Cell Ablation in Transgenic Zebrafish Embryos." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 546:133–43. doi: 10.1007/978-1-60327-977-2_9.
- Postnikova, T. Y., O. E. Zubareva, A. A. Kovalenko, K. K. Kim, L. G. Magazanik, and A. V. Zaitsev. 2017. "Status Epilepticus Impairs Synaptic Plasticity in Rat Hippocampus and Is Followed by Changes in Expression of NMDA Receptors." *Biochemistry (Moscow)* 82(3):282–90. doi: 10.1134/S0006297917030063.
- Prinz, Marco, Steffen Jung, and Josef Priller. 2019. "Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts." *Cell* 179(2):292–311.
- Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, Lawrence C. Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, and S. Mark Williams. 2001. "Acetylcholine." in *Neuroscience*, edited by Sinauer Associates. Sunderland (MA).
- Quinn, Daniel M. 1987. "Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States." *Chemical Reviews* 87(5):955–79. doi: 10.1021/cr00081a005.
- Quiñonez-Silvero, Claudia, Kathleen Hübner, and Wiebke Herzog. 2020. "Development of the Brain Vasculature and the Blood-Brain Barrier in Zebrafish." *Developmental Biology* 457(2):181–90. doi: 10.1016/J.YDBIO.2019.03.005.
- Raab, Spencer O. 1965. "Diisopropylfluorophosphate-P32 (DFP-P32) as a Label for Granulocytes." *Advances in Tracer Methodology* 2:261–66. doi: 10.1007/978-1-4684-8622-3_30.
- Raiford, Morgan B. 1949. "Clinical Evaluation of D.F.P. in Glaucoma Therapy." *American Journal of Ophthalmology* 32(10):1399–1403. doi: 10.1016/S0002-9394(49)91762-6.
- Raimondo, Joseph V., Richard J. Burman, Arieh A. Katz, and Colin J. Akerman. 2015. "Ion Dynamics during Seizures." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(OCTOBER).
- Rana, Amna, and Alberto E. Musto. 2018. "The Role of Inflammation in the Development of Epilepsy." *Journal of Neuroinflammation* 15.
- Ransohoff, Richard M. 2016. "A Polarizing Question: Do M1 and M2 Microglia Exist." *Nature Neuroscience* 19(8):987–91.
- Ravizza, Teresa, Silvia Balosso, and Annamaria Vezzani. 2011. "Inflammation and Prevention of Epileptogenesis." *Neuroscience Letters* 497(3):223–30. doi:

- 10.1016/j.neulet.2011.02.040.
- Reddy, Doodipala Samba. 2019a. "Mechanism-Based Novel Antidotes for Organophosphate Neurotoxicity." *Current Opinion in Toxicology* 14:35–45.
- Reddy, Doodipala Samba. 2019b. "Method of Treating Organophosphate Intoxication by Administration of Neurosteroids."
- Reemst, Kitty, Stephen C. Noctor, Paul J. Lucassen, and Elly M. Hol. 2016. "The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development." *Frontiers in Human Neuroscience* 10(NOV2016):566. doi: 10.3389/fnhum.2016.00566.
- Reiss, Richard, Ellen T. Chang, Rudy J. Richardson, and Michael Goodman. 2015. "A Review of Epidemiologic Studies of Low-Level Exposures to Organophosphorus Insecticides in Non-Occupational Populations." *Critical Reviews in Toxicology* 45(7):531–641.
- Réu, Pedro, Azadeh Khosravi, Samuel Bernard, Jeff E. Mold, Mehran Salehpour, Kanar Alkass, Shira Perl, John Tisdale, Göran Possnert, Henrik Druid, and Jonas Frisén. 2017. "The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain." *Cell Reports* 20(4):779–84. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.004.
- Riazi, Kiarash, Michael A. Galic, and Quentin J. Pittman. 2010. "Contributions of Peripheral Inflammation to Seizure Susceptibility: Cytokines and Brain Excitability." *Epilepsy Research* 89(1):34–42. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.09.004.
- Robu, Mara E., Jon D. Larson, Aidas Nasevicius, Soraya Beiraghi, Charles Brenner, Steven A. Farber, and Stephen C. Ekker. 2007. "P53 Activation by Knockdown Technologies." *PLOS Genetics* 3(5):e78. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.0030078.
- Rohlman, Diane S., W. Kent Anger, and Pamela J. Lein. 2011. "Correlating Neurobehavioral Performance with Biomarkers of Organophosphorous Pesticide Exposure." *NeuroToxicology* 32(2):268–76.
- Rousseau, J. M., I. Besse Bardot, L. Franck, N. Libert, G. Lallement, and P. Clair. 2009. "Intérêt de La Seringue Ineurop® Devant Une Intoxication Par Neurotoxique de Guerre." *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 28(5):482–88. doi: 10.1016/J.ANNFAR.2009.02.039.
- Rustenhoven, Justin, Thomas I. H. Park, Patrick Schweder, John Scotter, Jason Correia, Amy M. Smith, Hannah M. Gibbons, Robyn L. Oldfield, Peter S. Bergin, Edward W. Mee, Richard L. M. Faull, Maurice A. Curtis, E. Scott Graham, and Mike Dragunow. 2015. "Isolation of Highly Enriched Primary Human Microglia for Functional Studies." *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/srep19371.
- Ruzicka, Leyla, Douglas G. Howe, Sridhar Ramachandran, Sabrina Toro, Ceri E. Van Slyke, Yvonne M. Bradford, Anne Eagle, David Fashena, Ken Frazer, Patrick Kalita, Prita Mani, Ryan Martin, Sierra Taylor Moxon, Holly Paddock, Christian Pich, Kevin Schaper, Xiang Shao, Amy Singer, and Monte Westerfield. 2019. "The Zebrafish Information Network: New Support for Non-Coding Genes, Richer Gene Ontology Annotations and the Alliance of Genome Resources." *Nucleic Acids Research* 47(D1):D867–73. doi: 10.1093/nar/gky1090.
- Saïssy, J. M., and M. Rüttimann. 1999. "Intoxications Par Les Organophosphorés." Pp. 103–20 in *Médecine d'urgence 1999*, edited by Elsevier.

- Sasaki, Yo, Masato Hoshi, Chihiro Akazawa, Yasuko Nakamura, Hayami Tsuzuki, Kazuhide Inoue, and Shinichi Kohsaka. 2003. "Selective Expression of Gi/o-Coupled ATP Receptor P2Y₁₂ in Microglia in Rat Brain." *GLIA* 44(3):242–50. doi: 10.1002/glia.10293.
- Saternos, Hannah C., Daniyah A. Almarghalani, Hayley M. Gibson, Mahmood A. Meqdad, Raymond B. Antypas, Ajay Lingireddy, and Wissam A. Aboualaiwi. 2017. "Distribution and Function of the Muscarinic Receptor Subtypes in the Cardiovascular System." *Translational Physiology* 50:1–9. doi: 10.1152/physiolgenomics.00062.2017.
- Saxena, Ashima, Wei Sun, Chunyuan Luo, Todd M. Myers, Irwin Koplovitz, David E. Lenz, and Bhupendra P. Doctor. 2006. "Bioscavenger for Protection from Toxicity of Organophosphorus Compounds." Pp. 145–47 in *Journal of Molecular Neuroscience*. Vol. 30.
- Sayyah, M., M. Javad-Pour, and M. Ghazi-Khansari. 2003. "The Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide Enhances Seizure Susceptibility in Mice: Involvement of Proinflammatory Factors: Nitric Oxide and Prostaglandins." *Neuroscience* 122(4):1073–80. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2003.08.043.
- Scheffer, Ingrid E., and Rima Nabbout. 2019. "SCN1A-Related Phenotypes: Epilepsy and Beyond." *Epilepsia* 60(S3):S17–24. doi: 10.1111/epi.16386.
- Scorza, Carla A., Marcia J. G. Marques, Sérgio Gomes da Silva, Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti, Fulvio A. Scorza, and Esper A. Cavalheiro. 2018. "Status Epilepticus Does Not Induce Acute Brain Inflammatory Response in the Amazon Rodent Proechimys, an Animal Model Resistant to Epileptogenesis." *Neuroscience Letters* 668:169–73. doi: 10.1016/j.neulet.2017.02.049.
- Senba, Emiko, Keiji Matsunaga, Masaya Tohyama, and Koichi Noguchi. 1993. "Stress-Induced c-Fos Expression in the Rat Brain: Activation Mechanism of Sympathetic Pathway." *Brain Research Bulletin* 31(3–4):329–44. doi: 10.1016/0361-9230(93)90225-Z.
- Sfakianakis, Dimitris, Ioannis Leris, and Constantinos Mylonas. 2012. "Temperature during Early Life Determines Sex in Zebrafish, Danio Rerio (Hamilton, 1822)." *Journal of Biological Research* 17:68–73.
- Shams, Soaleha, Jason Rihel, Jose G. Ortiz, and Robert Gerlai. 2018. "The Zebrafish as a Promising Tool for Modeling Human Brain Disorders: A Review Based upon an IBNS Symposium." Pp. 176–90 in *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol. 85. Elsevier Ltd.
- Shen, Yijun, Weifeng Peng, Qinglan Chen, Bruce D. Hammock, Junyan Liu, Dongyang Li, Jun Yang, Jing Ding, and Xin Wang. 2019. "Anti-Inflammatory Treatment with a Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor Attenuates Seizures and Epilepsy-Associated Depression in the LiCl-Pilocarpine Post-Status Epilepticus Rat Model." *Brain, Behavior, and Immunity* 81:535–44. doi: 10.1016/j.bbi.2019.07.014.
- Sierra, Amanda, Rosa C. Paolicelli, and Helmut Kettenmann. 2019. "Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research." *Trends in Neurosciences* 42(11):778–92.
- De Simoni, Maria Grazia, Carlo Perego, Teresa Ravizza, Daniela Moneta, Mirko Conti, Francesco Marchesi, Ada De Luigi, Silvio Garattini, and Annamaria Vezzani. 2000. "Inflammatory Cytokines and Related Genes Are Induced in the Rat Hippocampus by

- Limbic Status Epilepticus.” *European Journal of Neuroscience* 12(7):2623–33. doi: 10.1046/J.1460-9568.2000.00140.X.
- Sisó, Sílvia, Brad A. Hobson, Danielle J. Harvey, Donald A. Bruun, Douglas J. Rowland, Joel R. Garbow, and Pamela J. Lein. 2017. “Spatiotemporal Progression and Remission of Lesions in the Rat Brain Following Acute Intoxication With Diisopropylfluorophosphate.” *Toxicological Sciences* 157(2):330–41. doi: 10.1093/TOXSCI/KFX048.
- Smith, Amy M., Hannah M. Gibbons, Robyn L. Oldfield, Peter M. Bergin, Edward W. Mee, Richard L. M. Faull, and Mike Dragunow. 2013. “The Transcription Factor PU.1 Is Critical for Viability and Function of Human Brain Microglia.” *GLIA* 61(6):929–42. doi: 10.1002/glia.22486.
- Sogorb, Miguel, Jorge Estevez, and Eugenio Vilanova. 2015. “Toxicokinetics and Toxicodynamics of DFP.” *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents: Second Edition* 857–74. doi: 10.1016/B978-0-12-800159-2.00057-9.
- Soltaninejad, Kambiz, and Shahin Shadnia. 2014. “History of the Use and Epidemiology of Organophosphorus Poisoning.” Pp. 25–43 in *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*, edited by M. Balali-Mood and M. Abdollahi. London: Springer London.
- Souders, CL, X. Liang, X. Wang, N. Ector, YH Zhao, and CJ Martyniuk. 2018. “High-Throughput Assessment of Oxidative Respiration in Fish Embryos: Advancing Adverse Outcome Pathways for Mitochondrial Dysfunction.” *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 199:162–73. doi: 10.1016/J.AQUATOX.2018.03.031.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. 2008. “The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio Rerio*.” *Biological Reviews* 83(1):13–34.
- Stainier, Didier Y. R., Erez Raz, Nathan D. Lawson, Stephen C. Ekker, Rebecca D. Burdine, Judith S. Eisen, Philip W. Ingham, Stefan Schulte-Merker, Deborah Yelon, Brant M. Weinstein, Mary C. Mullins, Stephen W. Wilson, Lalita Ramakrishnan, Sharon L. Amacher, Stephan C. F. Neuhauss, Anming Meng, Naoki Mochizuki, Pertti Panula, and Cecilia B. Moens. 2017. “Guidelines for Morpholino Use in Zebrafish.” *PLoS Genetics* 13(10). doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1007000.
- Staley, Kevin. 2015. “Molecular Mechanisms of Epilepsy.” *Nature Neuroscience* 18(3):367–72. doi: 10.1038/nn.3947.
- Stamper, Robert L., Marc F. Lieberman, and Michael V. Drake. 2009. “Cholinergic Drugs.” *Becker-Shaffer’s Diagnosis and Therapy of the Glaucomas: Eighth Edition* 420–30. doi: 10.1016/B978-0-323-02394-8.00027-9.
- Subramaniam, Sudhakar R., and Howard J. Federoff. 2017. “Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson’s Disease.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 9(JUN):176.
- Summerton, James. 1999. “Morpholino Antisense Oligomers: The Case for an RNase H-Independent Structural Type.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1489(1):141–58. doi: 10.1016/S0167-4781(99)00150-5.
- Thabet, H., N. Brahmi, N. Kouraïchi, H. Elghord, and M. Amamou. 2009. “Intoxications Par Les Pesticides Organophosphorés : Nouveaux Concepts.” *Reanimation* 18(7):633–39.

- Thijs, Roland D., Rainer Surges, Terence J. O'Brien, and Josemir W. Sander. 2019. "Epilepsy in Adults." *The Lancet* 393(10172):689–701.
- Torres, Luisa, Joan Danver, Kyungmin Ji, Jeremy T. Miyauchi, Danling Chen, Maria E. Anderson, Brian L. West, John K. Robinson, and Stella E. Tsirka. 2016. "Dynamic Microglial Modulation of Spatial Learning and Social Behavior." *Brain, Behavior, and Immunity* 55:6–16. doi: 10.1016/j.bbi.2015.09.001.
- Traiffort, Elisabeth, Abdelmoumen Kassoussi, Amina Zahaf, and Yousra Laouarem. 2020. "Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14:79.
- Tran, Steven, Amanda Facciol, and Robert T. Gerlai. 2020. "Behavioral Genetics of Embryonic Ethanol Exposure in Zebrafish: A Model for FASD." *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish* 343–62. doi: 10.1016/B978-0-12-817528-6.00021-8.
- Trede, Nikolaus S., David M. Langenau, David Traver, A. Thomas Look, and Leonard I. Zon. 2004. "The Use of Zebrafish to Understand Immunity." *Immunity* 20(4):367–79.
- Uchida, Daisuke, Michiaki Yamashita, Takeshi Kitano, and Taisen Iguchi. 2002. "Oocyte Apoptosis during the Transition from Ovary-like Tissue to Testes during Sex Differentiation of Juvenile Zebrafish." *Journal of Experimental Biology* 205(6):711–18. doi: 10.1242/jeb.205.6.711.
- Uchida, Shuji, Kunio Takeyasu, Seiji Ichida, and Hiroshi Yoshida. 1978. "Muscarinic Cholinergic Receptors in Mammalian Brain: Differences Between Bindings of Acetylcholine and Atropine." *Japanese Journal of Pharmacology* 28(6):853–62. doi: <https://doi.org/10.1254/jjp.28.853>.
- Var, Susanna R., and Christine A. Byrd-Jacobs. 2020. "Role of Macrophages and Microglia in Zebrafish Regeneration." *International Journal of Molecular Sciences* 21(13):1–17. doi: 10.3390/ijms21134768.
- Varga, Máté. 2016. "The Doctor of Delayed Publications - the Remarkable Life of George Streisinger." *The Node*. Retrieved June 18, 2021 (<https://thenode.biologists.com/doctor-delayed-publications-remarkable-life-george-streisinger/careers/>).
- Vezzani, Annamaria, Silvia Balosso, and Teresa Ravizza. 2019. "Neuroinflammatory Pathways as Treatment Targets and Biomarkers in Epilepsy." *Nature Reviews Neurology* 15(8):459–72.
- Vezzani, Annamaria, Jacqueline French, Tamas Bartfai, and Tallie Z. Baram. 2010. "The Role of Inflammation in Epilepsy." *Nature Reviews Neurology* 2010 7:1 7(1):31–40. doi: 10.1038/NRNEUROL.2010.178.
- Vezzani, Annamaria, Jacqueline French, Tamas Bartfai, and Tallie Z. Baram. 2011. "The Role of Inflammation in Epilepsy." *Nature Reviews. Neurology* 7(1):31–40. doi: 10.1038/nrneurol.2010.178.
- Vezzani, Annamaria, Alon Friedman, and Raymond J. Dingledine. 2013. "The Role of Inflammation in Epileptogenesis." *Neuropharmacology* 69:16–24.
- Viviani, Barbara, S. Bartesaghi, F. Gardoni, A. Vezzani, M. M. Behrens, T. Bartfai, M. Binaglia, E. Corsini, M. Di Luca, C. L. Galli, and M. Marinovich. 2003. "Interleukin-1 β Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation

- of the Src Family of Kinases.” *Journal of Neuroscience* 23(25):8692–8700. doi: 10.1523/jneurosci.23-25-08692.2003.
- Wager, Kim, Anselm A. Zdebik, Sonia Fu, Jonathan D. Cooper, Robert J. Harvey, and Claire Russell. 2016. “Neurodegeneration and Epilepsy in a Zebrafish Model of CLN3 Disease (Batten Disease).” *PloS One* 11(6). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0157365.
- Wakselman, Shirley, Catherine Béchade, Anne Roumier, Delphine Bernard, Antoine Triller, and Alain Bessis. 2008. “Developmental Neuronal Death in Hippocampus Requires the Microglial CD11b Integrin and DAP12 Immunoreceptor.” *Journal of Neuroscience* 28(32):8138–43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1006-08.2008.
- Walton, Eric M., Mark R. Cronan, Rebecca W. Beerman, and David M. Tobin. 2015. “The Macrophage-Specific Promoter Mfap4 Allows Live, Long-Term Analysis of Macrophage Behavior during Mycobacterial Infection in Zebrafish.” *PLoS ONE* 10(10):e0138949. doi: 10.1371/journal.pone.0138949.
- Walton, Marshall R., Hannah Gibbons, Geraldine A. MacGibbon, Ernest Sirimanne, Josep Saura, Peter D. Gluckman, and Michael Dragunow. 2000. “PU.1 Expression in Microglia.” *Journal of Neuroimmunology* 104(2):109–15. doi: 10.1016/S0165-5728(99)00262-3.
- Wang, D., and L. S. Fan. 2013. “Particle Characterization and Behavior Relevant to Fluidized Bed Combustion and Gasification Systems.” Pp. 42–76 in *Fluidized Bed Technologies for Near-Zero Emission Combustion and Gasification*. Elsevier Ltd.
- Wang, Jie, Zhi Jian Lin, Liu Liu, Hai Qing Xu, Yi Wu Shi, Yong Hong Yi, Na He, and Wei Ping Liao. 2017. “Epilepsy-Associated Genes.” *Seizure* 44:11–20. doi: 10.1016/j.seizure.2016.11.030.
- Wang, N., X. Mi, B. Gao, J. Gu, W. Wang, Y. Zhang, and X. Wang. 2015. “Minocycline Inhibits Brain Inflammation and Attenuates Spontaneous Recurrent Seizures Following Pilocarpine-Induced Status Epilepticus.” *Neuroscience* 287:144–56. doi: 10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.12.021.
- Wang, Yaming, Kristy J. Szretter, William Vermi, Susan Gilfillan, Cristina Rossini, Marina Cella, Alexander D. Barrow, Michael S. Diamond, and Marco Colonna. 2012. “IL-34 Is a Tissue-Restricted Ligand of CSF1R Required for the Development of Langerhans Cells and Microglia.” *Nature Immunology* 13(8):753–60. doi: 10.1038/ni.2360.
- Wang, Yushan S., and Thomas D. White. 1999. “The Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharide Causes Rapid Inappropriate Excitation in Rat Cortex.” *Journal of Neurochemistry* 72(2):652–60. doi: 10.1046/J.1471-4159.1999.0720652.X.
- Webster, Kyria M., Mujun Sun, Peter Crack, Terence J. O’Brien, Sandy R. Shultz, and Bridgette D. Semple. 2017. “Inflammation in Epileptogenesis after Traumatic Brain Injury.” *Journal of Neuroinflammation* 14(1):10. doi: 10.1186/s12974-016-0786-1.
- Webster, Rob. n.d. “Blood Brain Barrier Maturation: Implications for Drug Development.”
- Westerfield, Monte. 2000. “Breeding.” in *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, edited by Eugene. University of Oregon Press.
- White, Richard Mark, Anna Sessa, Christopher Burke, Teresa Bowman, Jocelyn LeBlanc, Craig Ceol, Caitlin Bourque, Michael Dovey, Wolfram Goessling, Caroline Erter Burns,

- and Leonard I. Zon. 2008. "Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis." *Cell Stem Cell* 2(2):183–89. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.002.
- Whitton, Peter S. 2007. "Inflammation as a Causative Factor in the Aetiology of Parkinson's Disease." *British Journal of Pharmacology* 150(8):963–76. doi: 10.1038/SJ.BJP.0707167.
- Wolf, Susanne A., H. W. G. M. Boddeke, and Helmut Kettenmann. 2017. "Microglia in Physiology and Disease." *Annual Review of Physiology*.
- Worek, Franz, Horst Thiermann, and Timo Wille. 2020. "Organophosphorus Compounds and Oximes: A Critical Review." *Archives of Toxicology* 94(7):2275–92. doi: 10.1007/s00204-020-02797-0.
- World Health Organization. 2008. *Clinical Management of Acute Pesticide Intoxication: Prevention of Suicidal Behaviours*. Geneva.
- World Health Organization. 2016. *Safer Access to Pesticides for Suicide Prevention Experiences from Community Interventions*. Geneva.
- World Health Organization. 2019. "Epilepsy." Retrieved May 10, 2021 (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>).
- Wright-Jin, Elizabeth C., and David H. Gutmann. 2019. "Microglia as Dynamic Cellular Mediators of Brain Function." *Trends in Molecular Medicine* 25(11):967–79.
- Xie, Jing, Eric Farage, Masahiko Sugimoto, and Bela Anand-Apte. 2010. "A Novel Transgenic Zebrafish Model for Blood-Brain and Blood-Retinal Barrier Development." *BMC Developmental Biology* 10(1):1–14. doi: 10.1186/1471-213X-10-76/FIGURES/7.
- Xu, Jin, Tienan Wang, Yi Wu, Wan Jin, and Zilong Wen. 2016. "Microglia Colonization of Developing Zebrafish Midbrain Is Promoted by Apoptotic Neuron and Lysophosphatidylcholine." *Developmental Cell* 38(2):214–22. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.018.
- Xu, Jin, Lu Zhu, Sicong He, Yi Wu, Wan Jin, Tao Yu, Jianan Y. Qu, and Zilong Wen. 2015. "Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish." *Developmental Cell* 34(6):632–41. doi: 10.1016/j.devcel.2015.08.018.
- Xu, Ling, Dan He, and Ying Bai. 2016. "Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease." *Molecular Neurobiology* 53(10):6709–15. doi: 10.1007/S12035-015-9593-4.
- Yaksi, Emre, Ahmed Jamali, Carmen Diaz Verdugo, and Nathalie Jurisch-Yaksi. 2021. "Past, Present and Future of Zebrafish in Epilepsy Research." *The FEBS Journal* 288(24):7243–55. doi: 10.1111/FEBS.15694.
- Yang, Fang, Zhi-Rong Liu, Jing Chen, Shi-Jun Zhang, Qing-Yun Quan, Yuan-Gui Huang, and Wen Jiang. 2010. "Roles of Astrocytes and Microglia in Seizure-Induced Aberrant Neurogenesis in the Hippocampus of Adult Rats." *Journal of Neuroscience Research* 88(3):519–29. doi: 10.1002/JNR.22224.
- Yuen, Alan W. C., Mark R. Keezer, and Josemir W. Sander. 2018. "Epilepsy Is a Neurological and a Systemic Disorder." *Epilepsy and Behavior* 78:57–61. doi: 10.1016/j.yebeh.2017.10.010.

- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, S. Meyers, K. L. Rhoades, C. J. Larson, H. M. Chen, S. W. Hiebert, and D. G. Tenen. 1996. "CCAAT Enhancer-Binding Protein (C/EBP) and AML1 (CBF Alpha2) Synergistically Activate the Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Promoter." *Molecular and Cellular Biology* 16(3):1231–40. doi: 10.1128/mcb.16.3.1231.
- Zhang, Lijuan, Jinqiang Zhang, and Zili You. 2018. "Switching of the Microglial Activation Phenotype Is a Possible Treatment for Depression Disorder." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12.
- Zhao, Shuai, Jian Huang, and Jun Ye. 2015. "A Fresh Look at Zebrafish from the Perspective of Cancer Research." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 34(1).
- Zhuang, Qinggeng, Amneh Young, Christopher S. Callam, Craig A. McElroy, Özlem Dogan Ekici, Ryan J. Yoder, and Christopher M. Hadad. 2016. "Efforts toward Treatments against Aging of Organophosphorus-Inhibited Acetylcholinesterase." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1374(1):94–104. doi: 10.1111/nyas.13124.
- Zusso, Morena, Laurent Methot, Rita Lo, Andrew D. Greenhalgh, Samuel David, and Stefano Stifani. 2012. "Regulation of Postnatal Forebrain Amoeboid Microglial Cell Proliferation and Development by the Transcription Factor Runx1." *Journal of Neuroscience* 32(33):11285–98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6182-11.2012.

Table des tableaux

Tableau 1 : résumé de différentes propriétés physicochimiques du tabun, du sarin, du soman, du VX et du DFP	21
Tableau 2 : efficacité relative des différentes oximes contre le tabun, le sarin, le soman et le VX	29
Tableau 3 : séquences des amorces utilisées pour la qPCR	71
Tableau 4 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression de <i>il-1β</i>	112
Tableau 5 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression de <i>il-8</i>	113
Tableau 6 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression de <i>il-4</i>	113
Tableau 7 : récapitulatif des niveaux relatifs d'expression du <i>tgf-β3</i>	113

Table des figures

Figure 1 : structure générale des OP.....	20
Figure 2 : structure de différents organophosphorés	21
Figure 3 : schéma de transmission du signal nerveux via l'acétylcholine	24
Figure 4 : représentation 3D de l'acétylcholinestérase et schéma de son fonctionnement	25
Figure 5 : inhibition, réactivation, réalkylation ou vieillissement de l'AChE après exposition à un OP	28
Figure 6 : classification des crises d'épilepsie selon l'ILAE en 2017	32
Figure 7 : cycle auto-entretenu de l'inflammation et de l'épilepsie	36
Figure 8 : observations de la microglie par del Río Hortega à l'aide de la coloration de Golgi	37
Figure 9 : évolution du nombre d'articles traitant de la microglie au cours des années	38
Figure 10 : les nombreuses fonctions de la microglie dans le cerveau.....	43
Figure 11 : activation de la microglie.....	46
Figure 12 : développement embryonnaire du poisson zèbre	49
Figure 13 : dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre	51
Figure 14 : entrée des macrophages primitifs dans le cerveau du poisson zèbre par 2 voies distinctes	54
Figure 15 : colonisation du cerveau du poisson zèbre par des macrophages primitifs et différenciation en microglie.....	55
Figure 16 : origines distinctes de la microglie embryonnaire et adulte chez le poisson zèbre.....	56
Figure 17 : transparence de la lignée casper.....	58
Figure 18 : consommation d'O ₂ altérée des larves exposées au DFP	99
Figure 19 : changements morphologiques de la microglie après exposition au DFP.....	104
Figure 20 : les cellules microgliales sont davantage mobiles après exposition au DFP.....	107
Figure 21 : profil inflammatoire dans les larves entières au cours du temps après exposition au DMSO ou au DFP.....	108
Figure 22 : profil neuroinflammatoire des larves exposées au DMSO ou au DFP	110
Figure 23 : profil inflammatoire de larves avec ou dépourvues de cellules microgliales après exposition au DMSO ou au DFP	112
Figure 24 : conséquences de l'ablation de la microglie sur l'activité neuronale après exposition au DFP	115
Figure 25 : Stratégies de neutralisation des OP à l'aide de bioscavengers	128