



HAL
open science

Étude in vitro des effets neurotoxiques et neuro-inflammatoires de trois toxiques environnementaux analogues d'acides aminés sur des modèles de culture de cellules souches neurales

Sarah Méresse

► **To cite this version:**

Sarah Méresse. Étude in vitro des effets neurotoxiques et neuro-inflammatoires de trois toxiques environnementaux analogues d'acides aminés sur des modèles de culture de cellules souches neurales. Biologie cellulaire. Université d'Orléans, 2023. Français. NNT : 2023ORLE1013 . tel-04311675

HAL Id: tel-04311675

<https://theses.hal.science/tel-04311675>

Submitted on 28 Nov 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 D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT
INEM UMR 7355 – CNRS

THÈSE présentée par :

Sarah MÉRESSE

Soutenue le : 11 juillet 2023

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Biologie. Biologie cellulaire – Neurotoxicologie**

Etude *in vitro* des effets neurotoxiques et neuro-inflammatoires de trois toxiques environnementaux analogues d'acides-aminés sur des modèles de culture de cellules souches neurales

THÈSE dirigée par :

M. Stéphane Mortaud

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Mme. Raphaële Boydron-Le Garrec

Maître de Conférence, Université de Brest

Mme. Laurence Gamet-Payraastre

Directrice de recherche, INRAE

JURY :

M. Stevee Thany

Professeur, Université d'Orléans, Président du jury

Mme. Raphaële Boydron-Le Garrec

Maître de Conférence, Université Bretagne-Occidentale

Mme. Laurence Gamet-Payraastre

Directrice de recherche, INRAE

M. Nicola Marchi

Chargé de recherche, CNRS

Mme. Agnès Petit-Paitel

Chargée de recherche, CNRS

M. Stéphane Mortaud

Professeur, Université d'Orléans

“Le vent se lève !... Il faut tenter de vivre !”

P. V

“Le bout du monde et le fond du jardin contiennent la même quantité de merveilles.”

C. B

Remerciements

Mme. Raphaële Boydron-Le Garrec et Mme. Laurence Gamet-Payraastre ont accepté d'être les rapportrices de ce travail, je vous adresse ici mes remerciements. Ma reconnaissance va également aux autres membres de mon jury, M. Steeve Thany, M. Nicola Marchi et Mme. Agnès Petit-Paitel. La réalisation de mes travaux de recherche s'est effectuée sous la direction du Professeur Stéphane Mortaud, au sein de l'INEM (Immunologie et Neurogénétique Expérimentale et Moléculaire). Dans un premier temps je remercie la directrice Mme. Valérie Quesniaux ainsi que M. Bernhard Ryffel pour leur accueil. Je souhaiterais faire part de mon affection à l'ensemble des membres du laboratoire. Merci pour les échanges que nous avons pu avoir.

Mes remerciements sont ici pour mon directeur de thèse, Stéphane. Pendant ces années, tu m'as témoigné ta confiance et ton appui. Même s'il me sera difficile de t'exprimer toute l'estime que j'ai pour toi, je tiens à te remercier pour la formation que tu m'as prodiguée. Je ne connais personne qui ait ta culture et ta curiosité vis à vis du monde, et qui les partage avec autant de passion et d'humour. Un grand merci.

Je tiens à remercier chacun des membres de mon équipe qui sont intervenus de près ou de loin au cours de ma thèse. Un grand merci à Arnaud, pour ton soutien et ta disponibilité que ça soit pour la partie recherche ou enseignement. Merci aussi à Vanessa, Flora, Anthony L., Maryvonne et Céline. Les moments café ainsi que « *tea-time* » ont été précieux. Merci aussi à Dame Asma, Yasmine, Amir, Elodie, Vidian, Rania, Dorian, Meriem, Atika et bien sûr Sarah. Grâce à vous le laboratoire arborait toujours de belles couleurs. Je tiens aussi à exprimer mon amitié envers l'équipe immuno, notamment mon ancienne colocatrice de bureau, Isa. Mes remerciements vont également à Sara Šormaz (Puno ti hvala !), et aux étudiants ayant passé quelques mois au laboratoire : Aurélia, Sara, Lucile, Solène et Christian. Un grand merci également à Mostefa pour nous avoir confié la Marennine et surtout pour l'ensemble de tes *très* précieux conseils.

Même si une thèse se réalise principalement au laboratoire, elle se joue aussi au-delà de ses murs. Je remercie ceux qui, officiellement furent les plus loins de cette thèse, mais officieusement en furent les plus proches. Je remercie du fond du cœur mes Amis et ma Famille. Merci pour votre présence contre vents et marées. Les copains, vous m'avez aidé à combattre les monstres au propre comme au figuré. "*Lourd est le Parpaing de la Réalité sur la Tartelette aux Fraises de nos Illusions*" ; vous avez tout rendu plus doux à votre façon : merci.

Morgane, merci pour ton intérêt quotidien : tu es ma sœur préférée. Un incommensurable merci à mes parents : Papa, Maman... merci pour tout. Cette thèse est aussi la vôtre.

Je remercie tous ceux que j'ai rencontrés, qui m'ont bousculé, formé, aidé, professionnellement et personnellement. Chacun à votre façon, vous m'avez fait grandir... même si je ne dépasse pas 1m64.

Table des matières

<i>Index des figures</i> :	10
<i>Productions scientifiques</i>	13
<i>Liste des abréviations</i>	15
<i>Préambule</i>	16
Introduction	20
Chapitre 1 :	21
<i>Molécules d'origines naturelles et anthropiques et interactions avec les systèmes glutamatergiques</i> ..	21
I) La neurotoxine BMAA.....	21
1. Microalgues, cyanobactéries	21
A) Généralités.....	21
B) Prolifération et conséquences	21
C) Les cyanotoxines	22
2. La β -méthylamino-L-alanine (BMAA)	22
A) Organismes producteurs	23
a) Les Cycas et autres végétaux.....	23
b) Les cyanobactéries.....	23
c) Microalgues.....	24
B) Production de BMAA et rôle écophysio­logique au sein des microalgues	27
a) Voie de biosynthèse	27
b) Facteurs influençant la production et la libération de BMAA	27
c) Rôle écophysio­logique de la BMAA au sein des organismes producteurs	29
C) Etude de toxicité de la BMAA.....	31
a) <i>In vitro</i>	31
b) <i>In vivo</i>	32
c) Chez l'être humain	36
d) Mécanismes putatifs de la BMAA	38
II) Les pesticides	43
1. Définition et classification.....	43
2. Pesticides et maladies neurodégénératives	43
3. Utilisation des pesticides en France.....	44
4. Le glyphosate et le glufosinate d'ammonium	45
A) Structures chimiques et formules commerciales	45
a) Mécanismes d'actions (cibles)	46
B) Etude toxicologique de xénobiotique.....	46

C)	Le Glyphosate	48
a)	Cible principale	48
b)	Valeurs toxicologiques	48
c)	Etudes épidémiologiques et expérimentales	49
D)	Le glufosinate d'ammonium	53
a)	Cible principale	53
b)	Valeurs toxicologiques	54
c)	Etudes épidémiologiques	54
d)	Etudes expérimentales	55
III)	Interactions des molécules naturelles et anthropiques avec les systèmes glutamatergiques	59
1.	Le glutamate	59
A)	Synthèse du glutamate	59
B)	Rôle du glutamate dans la synthèse protéique	60
C)	Rôle du glutamate dans la signalisation cellulaire du SNC	60
a)	Les récepteurs au glutamate	60
b)	Les antagonistes des GluR	64
Chapitre 2 :	66
<i>Neurogenèse secondaire et niches neurogéniques</i>	66
I)	Neurogenèse et gliogenèse	66
1.	Neurogenèse primaire	66
2.	Neurogenèse secondaire	67
A)	Au niveau de l'hippocampe	67
B)	La zone sous-ventriculaire	68
a)	Les cellules épendymaires	71
b)	Les cellules B1	71
c)	Les cellules C	72
d)	Les neuroblastes	72
e)	Les précurseurs d'oligodendrocytes (OPC, <i>Oligodendrocytes precursors cells</i>)	72
f)	Les astrocytes	73
g)	Les cellules microgliales	75
Chapitre 3 :	78
<i>Phénomènes neuro-inflammatoires</i>	78
I)	La Neuro-inflammation	78
1.	Généralités	79
a)	L'Interleukine-6	80
b)	Le Tumor Necrosis Factor α	81

c) L'Interleukine-1 β	83
2. Neuro-inflammation et neurodégénérescence	84
II) Méthodes d'évaluation	86
1. <i>In vivo</i>	87
2. <i>In vitro</i>	87
Matériel & Méthodes.....	90
I) Culture cellulaire.....	91
1. Modèle murin	91
2. Préparation à la mise en culture : dissection	91
3. Traitement	92
II) MTT.....	92
III) LDH-Glo	93
IV) Immunocytochimie	93
V) Transparisation et microscopie confocale.....	95
VI) Cytométrie en flux.....	95
VII) RT-qPCR.....	96
VIII) Analyse protéomique	98
9. Analyses statistiques.....	99
Résultats.....	100
Etude n°1. Etude de l'effet de la toxine BMAA sur des populations de cellules issues de la niche neurogénique SVZ et investigation de son potentiel neuro-inflammatoire.....	101
A. Contexte de l'étude	101
B. Résultats	103
C. Discussion et conclusions.....	115
Etude n°2. Etude comparative des effets des toxiques seuls ou en mélange (MIX) sur les populations de cellules issues de la niche neurogénique SVZ et investigation de leurs effets neuro-inflammatoires	120
A. Contexte de l'étude	120
B. Résultats	123
C. Discussions et conclusions	132
Discussion.....	137
Conclusion.....	150
Références	154
Annexes.....	181

Index des figures :

Figure 1 : Représentation des différents facteurs à considérer lorsque l'on tend à considérer l'exposome.	18
Figure 2 : Structure de la β -N-Méthylamino-L-alanine (BMAA) et ses trois isomères.	22
Figure 3 : Cyanobactéries et cycas.	24
Figure 4 : Voie de bioaccumulation hypothétique au sein de l'écosystème de l'étang de Thau.	25
Figure 5 : <i>Noctiluca scintillans</i>	26
Figure 6 : Voie biochimique proposée pour la synthèse de la BMAA comme proposé par Brenner et al. (2003).	27
Figure 7 : Représentation des dynamiques entre la production de BMAA et les efflorescences de microalgues, ici les cyanobactéries.	28
Figure 8 : Effets de la BMAA sur la croissance de Nostoc 7120.	30
Figure 9 : Paysage génétique de la SLA entre 1993 et 2016 et les processus biologiques impliqués.	37
Figure 10 : Conséquence de la présence de la BMAA sous deux formes (formes libres et formes liées)	38
Figure 11 : L'adduit de carbamate de BMAA peut simuler un agoniste du glutamate.	39
Figure 12 : Le développement des enchevêtrements neurofibrillaires tau (NFT).....	40
Figure 13 : Aspects moléculaires des mécanismes de neurodégénérescence potentiellement induits par la BMAA.....	42
Figure 14 : Les différentes familles de pesticides.	43
Figure 15 : Principales substances actives des herbicides utilisées sur plantes sarclées et leur classification toxicologique.....	45
Figure 16 : Structure chimique des deux herbicides étudiés..	46
Figure 17 : Métabolisme général des xénobiotiques.....	47
Figure 18 : Illustration des paramètres toxicologiques et leur toxicité associée.....	49
Figure 19 : Effet du glyphosate (GLY) sur la prolifération cellulaire sur culture primaire embryonnaire de cellules souches.....	51
Figure 20 : Structure chimique du glyphosate et de son métabolite majeur, l'AMPA, du glutamate et de la glycine.....	51
Figure 21 : Amino acid glufosinate targets glutamine synthetase.....	54
Figure 22 : L'exposition périnatale au glufosinate ammonium perturbe les paramètres neurodéveloppementaux.....	55
Figure 23 : Illustration de l'effet du glufosinate d'ammonium sur la neurogenèse via culture <i>ex vivo</i> d'un explant de SVZ provenant de souris exposées en périnatal.....	57
Figure 24 : Effet du glufosinate d'ammonium (GLA) sur la prolifération cellulaire, la génotoxicité et les phénomènes apoptotiques sur culture primaire embryonnaire de cellules souches.....	58
Figure 25 : Effets du glufosinate d'ammonium sur la différenciation cellulaire. Effet du glufosinate d'ammonium sur les populations cellulaires de la SVZ.....	58
Figure 26 : Synthèse du glutamate.....	60
Figure 27 : Organisation d'un hétéromère du récepteur GluA1/2 AMPA associé à TARP γ 8.....	62
Figure 28 : Structure du récepteur NMDA.....	63
Figure 29 : Réponse à l'excitotoxicité selon le mode de culture.....	89
Figure 30 : Timeline de l'invasion de la microglie, de la gliogenèse et de plusieurs processus de développement dans le cerveau murin (souris) en cours de développement.....	67
Figure 31 : Neurogenèse hippocampique adulte chez la souris.	68
Figure 32 : Représentation d'un cerveau de mammifère adulte (coupe sagittale).....	69
Figure 34 : Représentation schématique de la niche V-SVZ et SGZ.....	70

Figure 35 : Représentation schématique des marqueurs de différenciation des oligodendrocytes.	73
Figure 36 : Photographie d'immunocytochimie représentant le degré de myélinisation selon la différenciation oligodendrogliale.	73
Figure 37 : Représentation des associations cellulaires formant la BHE.	74
Figure 38 : Signalisation des astrocytes dans un contexte neuro-inflammatoire	75
Figure 39 : Morphologie de la microglie	76
Figure 40 : Altération de la neurogenèse chez des souris déficientes en lymphocytes T.	81
Figure 41 : Effets d'une neuro-inflammation sur la neurogénèse secondaire.	82
Figure 42 : Liens potentiels entre une exposition à des polluants de l'environnement et l'apparition de perturbations neurologiques.	86
Figure 43 : Représentation des différentes phases de culture pour les modèle 2D et 3D.	92
Figure 44 : Représentation du protocole expérimental pour l'évaluation des effets de la BMAA sur les NSCs.	103
Figure 45 : Effets de la BMAA sur la toxicité et la viabilité de cellules souches neurales (NSCs) et différenciées.	104
Figure 46 : Effets de la BMAA sur modèle <i>in vitro</i> d'organoïde cérébral.	105
Figure 47 : Prolifération des cellules souches après exposition à la BMAA dans une culture de cellules souches neurales (NSCs).	105
Figure 48 : Effets de la BMAA sur la différenciation des cellules souches neurales (NSCs).	107
Figure 49 : Microscopie confocale de neurosphères après une semaine de traitement à 100µM de BMAA.	108
Figure 50 : Effets de 100µM de BMAA sur la population et l'organisation des neuroblastes au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation.	109
Figure 51 : Microscopie à fluorescence de la population de neuroblastes ayant migrés à partir des neurosphères sur matrigel.	110
Figure 52 : Effets de la BMAA sur le statut d'activation des cellules ACSA2+ et microgliales au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation.	112
Figure 53 : Effets de la BMAA sur la morphologie des cellules microgliales au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation.	113
Figure 54 : Effets de la BMAA sur la libération de cytokines pro-inflammatoires au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation.	114
Figure 55 : Evaluation des niveaux de phospho-kinase après une semaine de traitement sur culture de cellules souches neurales (NSCs) avec 100µM de BMAA en cours de différenciation.	115
Figure 56 : Protocole expérimental pour l'évaluation des effets de 100µM BMAA ou 30µM Glyphosate (GLY) ou 3µM de glufosinate d'ammonium (GLA) ou une combinaison des trois (MIX) au sein des cultures de NSCs en différenciation.	122
Figure 57 : Effets de 100µM de BMAA ou de 30µM de glyphosate (GLY) ou de 3µM de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur la viabilité cellulaire au sein de culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation..	123
Figure 58 : Effets de 100µM de BMAA ou de 30µM de glyphosate (GLY) ou de 3µM de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur la viabilité cellulaire au sein de culture de cellules souches neurales (NSCs) sur la différenciation cellulaire.	125
Figure 59 : Effets de 100µM de BMAA ou de 30µM de Glyphosate (GLY) ou de 3µM de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur le statut d'activation des cellules ACSA2+ (B1 et astrocytes) et des cellules microgliales.	126
Figure 60 : Effets de 100µM de BMAA ou de 30µM de Glyphosate (GLY) ou de 3µM de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur la libération de cytokines pro-inflammatoires.	129

Figure 61 : Observation et mesure des neurosphères après une semaine de traitement au cocktail de polluants (MIX)..	130
Figure 62 : Etude des populations ACSA2+/GFAP+ et des populations de cellules microgliale suite à un traitement d'une semaine au cocktail de composé (MIX)	131
Figure 63 : Effets du cocktail de polluants (MIX) sur la libération de cytokines et pro-inflammatoires	132
Figure 64 : Effets du cocktail de polluants (MIX) sur l'expression de Nfkb, Stat3, Il-6.	132
Figure 65 : Augmentation du nombre de cellules microgliale chez les embryons de souris ayant été exposées au molécules, seules ou en combinaison.	141
Figure 66 : Altération de la morphologie des cellules microgliales chez les embryons de souris ayant été exposées aux molécules seules ou en combinaison via leur mère	142
Figure 67 : Altérations morphométriques induites par la BMAA dans les neurones primaires du bulbe olfactif de la souris	143
Figure 68 : Mesure de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) et anti-inflammatoire (IL-10)	144
Figure 69 : Effets de la BMAA sur les récepteurs NMDA et AMPA.	145
Figure 70 : Marquage d'une neurosphère au Bleu Evans	147
Figure 71 : Neurogenèse de la zone sous-ventriculaire (SVZ) dans le cerveau de la souris (à gauche) et de l'homme (à droite).	148
Figure 72 : Modélisation des MND.	149
Figure 73 : Principe de l'étude d'AOP d'après le <i>National Toxicology Program</i>	149

Productions scientifiques

Publications

2023

Oummadi A., Menuet A., Méresse S., Laugeray A., Guillemain G. and Mortaud S. The herbicides Glyphosate, Glufosinate and the cyanotoxin BMAA induce long-term motor disorders after postnatal exposure: importance of a prior asymptomatic maternal inflammatory sensitization. (*accepted in Frontiers of Neurosciences*)

Méresse S., Gateau H., Tirnan T., Larrigaldie V., Casse N., Pasetto P., Mouget J.-L., Mortaud S., Fodil M. Haslea ostrearia Pigment Marennine Affects Key Actors of Neuro-inflammation and Decreases Cell Migration in Murine Neuroglial Cell Model. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 11;24(6):5388. doi: 10.3390/ijms24065388. PMID: 36982463

2022

Méresse S., Larrigaldie V., Oummadi A., de Concini V., Morisset-Lopez S., Reverchon F., Menuet A., Montécot-Dubourg C., Mortaud S. β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin promotes modification of undifferentiated cells population and disrupts the inflammatory status in primary cultures of neural stem cells. *Toxicology.* 2022 Oct 27;482:153358. doi: 10.1016/j.tox.2022.153358. Epub ahead of print. PMID: 36309149.

2020

Méresse S., Fodil M, Fleury F, Chénais B. Fucoxanthin, a Marine-Derived Carotenoid from Brown Seaweeds and Microalgae: A Promising Bioactive Compound for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 4;21(23):9273. doi: 10.3390/ijms21239273. PMID: 33291743; PMCID: PMC7730715.

Présentations orales et affichées

2023

Méresse S., Mortaud S. « β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin promotes modification of undifferentiated cells population and disrupts the inflammatory status in primary cultures of neural stem cells ». *NeuroFrance*, 24-26 May 2023, Lyon (poster)

Méresse S., « Haslea ostrearia Pigment Marennine Affects Key Actors of Neuro-inflammation and Decreases Cell Migration in Murine Neuroglial Cell Model ». *Colloque Réseau Molécules marines, métabolisme et cancer*, 11-12 mai 2023, Mansigné (présentation orale)

2022

Méresse S., « Biomolécules environnementales et processus neuro-inflammatoires », *Réunion Ax-One, CHRO Orléans*, 24 novembre 2022 (présentation orale)

Méresse S., Mortaud S. « β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin promotes modification of undifferentiated cells population and disrupts the inflammatory status in primary cultures of neural stem cells » *34e Colloque BiotechnoCentre*, 20-21 Oct 2022, Nouan le Fuzelier (poster)

Méresse S., Mortaud S. « β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin promotes modification of undifferentiated cells population and disrupts the inflammatory status in primary cultures of neural stem cells » 1ère rencontre Ax-One, 06 mai 2022, Orléans (poster)

Méresse S., Tirnan T., Culerier E., Gâteau H., Larrigaldie V., Casse N., Pasetto P., Mouget J-L., Mortaud S., Fodil M. « *In vitro* assessment of the inflammatory power of the Haslea ostrearia's blue polysaccharid pigment "Marennine" in primary neuroglia culture » 1ère rencontre Ax-One, 06 mai 2022, Orléans (poster)

2021

Méresse S., de Concini V, Oummadi A, Larrigaldie V, Mortaud S. Environmental toxicants induces neuro-inflammation in neurospheroids model ? XV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 05-09 July 2021, Marseille (poster).

Méresse S., Montécot-Dubourg C., Mortaud S. Environmental toxicants induces neuro-inflammation in neural stem cell cultures » 33e Colloque BiotechnoCentre, 7 Oct 2021, Les Hauts de Bruyères (Poster et présentation orale)

Méresse S., Effets neurotoxiques de polluants de l'environnement sur des cellules souches neurales *in vitro*, SFR FED 4226, 14th Oct 2021 (présentation orale)

Liste des abréviations

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>	PLL	Poly-L-lysine
AChE	Acétylcholinestérase	GLA	Glufosinate d'ammonium	PND	<i>Postnatal day</i>
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisation et Elimination	Glu	Glutamate	PNH	Primate non-humains
ADN	acide désoxyribonucléique	GLY	Glyphosate	POEA	Polyoxyéthylène amine
ADNc	ADN complémentaire	GPX	Glutathion peroxydase	Poly (I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
AEG	N-(2-aminoéthyl)glycine	GS	Glutamine synthetase	PPO	Protoporphyrinogen oxidase
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	GSH	Glutathion	RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
APP	<i>amyloid precursor protein</i>	GSK-3	Glycogène synthase kinase 3	RMS	<i>Rostral migratory stream</i>
ARN	acide ribonucléique	GST	Glutathion S-transférase	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Aβ	<i>Amyloid β</i>	HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>	RT	<i>Reverse Transcription</i>
BAMA	β-amino-N-méthyl alanine	ICC	Immunocytochimie	RT-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	iGluR	<i>Ionotropic glutamate receptors</i>	SGZ	<i>Subgranular zone</i>
BHE	Barrière hémato encéphalique	IL-10	Interleukine 10	SLA	<i>Sclérose Latérale Amyotrophique</i>
BMAA	β-N-méthylamino-L-alanine	IL-1β	Interleukine 1 bêta	SLA-PDC	<i>SLA-Parkinson Disease complex</i>
BO	Bulbes olfactifs	IL-6	Interleukine 6	SLC	<i>Solute carrier</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>	LCR	Liquide céphalo-rachidien	SNC	Système nerveux central
CC3	<i>Cleaved caspase-3</i>	LDH	Lactate deshydrogénase	SNP	Système nerveux périphérique
CEA	Le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives	LOAEL	<i>Lowest-observed-adverse-effect level</i>	SOD	Superoxyde dismutase
CHPG	(RS)-2-chloro-5-hydroxyphénylglycine	LPS	Lipopolysaccharide	SSC	<i>Side scatter</i>
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer	MA	Maladie d'Alzheimer	SVZ	<i>Subventricular zone</i>
CL50	Concentration Létale 50	MAM	méthylazoxyméthanol	TDP-43	TAR DNA-binding protein 43
CMR	Cancérogène, mutagène et reprotoxique	MAP	<i>Microtubule associated protein</i>	TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
DAB	<i>diaminobutyric acid</i>	MBP	<i>Myelin basic protein</i>	TLR	<i>Toll-like receptors</i>
DAP	Acide 2,3-diaminopropionique	mGluR	<i>Metabotropic glutamate receptor</i>	TNFα	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
DCX	Doublecortine	MND	Maladie neurodégénérative		
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane	MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>	TSA	Trouble du spectre de l'autisme
DG	<i>Dendate gyrus</i>	MP	Maladie de Parkinson	ULA	<i>Ultra Low Attachment</i>
DJA	Dose Journalière Autorisée	MTT	(bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium	UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
DL50	Dose Létale 50	NAM	<i>Negative Allosteric Modulators</i>	Xc	<i>Cystine/glutamate transporter</i>
DMSO	diméthylsulfoxyde	NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>		
DNT	<i>developmental neurotoxicity</i>	NMDA	N-méthyl-D-aspartate		
dNTP	désoxynucléosides triphosphates	NO	<i>Nitric oxide</i>		
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>	NOAEL	<i>Non observed adverse effect level</i>		
ED	<i>Embryonal Day</i>	NSCs	<i>Neural stem cells</i>		
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques		
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	OPC	Oligodendrocyte progenitor cells		
EPSPS	la 5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	PAM	<i>Positive Allosteric Modulators</i>		
FGF	<i>Fibroblast growth factors</i>	PCD	<i>Programmed Cell Death</i>		
FSC	<i>forward scatter</i>	PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>		
GABA	acide gamma-aminobutyrique	PLC	Phospholipase C		
GBH	<i>Glyphosate-based herbicids</i>	PFA	Paraformaldéhyde		

Préambule

Contexte de l'étude

Le changement climatique induit des modifications néfastes pour l'équilibre des écosystèmes aquatiques (1). Les dérèglements du climat se caractérisent notamment par une élévation des températures, tant des eaux marines que dulcicoles. Ces modifications affectent la fréquence, la biogéographie ainsi que l'ampleur des efflorescences (« blooms ») de microalgues et cyanobactéries (2–4). Outre la température, l'eutrophisation des milieux aquatiques est également responsable de la prolifération des microalgues et cyanobactéries. En 1995, Nixon a proposé que l'eutrophisation pourrait être définie comme « une augmentation du taux d'approvisionnement en matière organique d'un écosystème » (5). Le terme eutrophisation décrit un processus plutôt qu'un état trophique. A échelle locale ces importantes proliférations consomment une grande partie – si ce n'est la totalité – de l'oxygène dissout dans l'eau, conduisant à des « zones mortes ». De ce fait, ces efflorescences sont non seulement toxiques pour l'écosystème dans lequel elles se développent, mais elles le sont également pour les réseaux trophiques associés. De plus, ces organismes microscopiques sont susceptibles de produire des toxines auxquelles les animaux, dont l'être humain, peuvent être exposés. A l'échelle mondiale les toxines d'algues marines causeraient plus de 60.000 incidents d'intoxications par an (6). Ces chiffres concernent principalement les intoxications aiguës, c'est-à-dire lorsque l'organisme est sujet à une exposition unique. En revanche, il existe très peu de données sur les conséquences des expositions subchroniques et chroniques sur la santé humaine.

Les microalgues et cyanobactéries produisent une myriade de métabolites secondaires, biologiquement actifs. Certains sont utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et de nombreux composés sont étudiés en recherche scientifique appliquée pour leurs potentiels effets anticancéreux, antimicrobiens, antiviraux ainsi qu'anti-inflammatoires (7–9). Cependant, dans le cadre de l'utilisation de ces produits à des fins alimentaires soulève des inquiétudes concernant la toxicité potentielle et les effets à long terme sur la santé humaine. Par exemple, une des sources de préoccupation est l'utilisation de complément alimentaire à base de spiruline. D'un côté, les spirulines contiennent une myriade de molécules procurant des bienfaits pour la santé du cerveau, tels que des antioxydants, des anti-inflammatoires et des neuroprotecteurs (10), d'un autre côté il a été mis en évidence dans ces produits la présence de toxines néfastes pour la santé humaine (11). Entre autres, cette étude reporte la présence de microcystines, d'anatoxine-a, d'époxyanatoxine-a, de saxitoxine ainsi que de β -méthylamino-L-alanine (BMAA). Cette dernière, qui va particulièrement nous intéresser dans cette thèse, est notamment reconnue comme étant une neurotoxine. Bien que la réglementation en vigueur exige que ces produits soient testés pour la présence de toxines, certaines sont non détectables ou non identifiées comme toxiques.

Le système nerveux central (SNC) est protégé par une barrière physique, la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière est un filtre extrêmement sélectif à travers laquelle les nutriments nécessaires au cerveau sont acheminés. Néanmoins, certaines molécules d'origine anthropiques ou naturelles (telles que les toxines) sont susceptibles de passer la BHE. La BMAA a la capacité de franchir la BHE via les transporteurs d'acides aminés (12). Au sein du SNC, il a été notamment identifié que la BMAA pouvait interférer avec les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques notamment via les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) et ionotropiques (iGluR) tels que les N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (13–16). Outre les possibilités démontrées de la BMAA d'interagir directement avec les cellules du SNC, la persistance des effets induits par la BMAA pourrait être liée à des altérations épigénétiques qui interfèrent avec la programmation des cellules souches (17). Ces résultats interrogent sur les effets de la BMAA sur les neurogenèses primaires et secondaires ainsi que sur les conséquences à long terme d'une exposition à la toxine. Ce questionnement évoque l'hypothèse de Baker, mieux connue sous le nom d'origines développementales de la santé et de la maladie (*Developmental Origins of Health and Disease*, DOHaD), précisant qu'une atteinte précoce, notamment pendant la vie périnatale, est susceptible d'entraîner des conséquences néfastes à long terme et potentiellement prédisposer aux troubles neurodéveloppementaux ou aux maladies neurodégénératives plus tard dans la vie.

La BMAA est suspectée d'avoir un rôle dans l'étiologie de maladies neurodégénératives (MND), notamment la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Cependant selon les critères de Hill, qui sont un groupe de conditions minimales pour fournir une causalité établit entre deux événements, la BMAA serait un facteur insuffisant pour expliquer la survenue de la SLA ou d'affections neurologiques apparentées. Néanmoins, l'hypothèse qu'il s'agisse d'un facteur favorisant ou aggravant les phénomènes neurotoxiques semble avérée, principalement en raison de sa capacité à interagir sur plusieurs mécanismes impliqués dans les MND (18).

Il existe un nombre important de pathologies ayant des origines dites multifactorielles, c'est-à-dire qu'elles résultent de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. C'est le cas de nombreux cancers et de MND telles que la SLA ou maladie de Parkinson (MP) (19). Cette dernière, reconnue comme maladie professionnelle depuis 2012, peut notamment faire suite à une exposition à des polluants environnementaux, tels que le paraquat (20). De façon intéressante, certains pesticides favorisent l'eutrophisation des milieux aquatiques en apportant des éléments nutritifs favorisant les phénomènes d'efflorescence algales. Il y a donc une corrélation entre les cyanobactéries (et microalgues) et les pesticides, qui participent à leur prolifération.

Ces différents points montrent la nécessité de considérer l'exposome. L'exposome est une notion toxicologie qui souligne la nécessité de prendre en considération la totalité des facteurs environnementaux auxquels un individu est sujet depuis son existence *in utero* jusqu'à la fin de sa vie. Les expositions ne se limitent pas aux toxiques qui pénètrent dans l'organisme, mais comprennent un ensemble de facteur visible en Figure 1. De façon assez intelligible, l'intégration de l'ensemble de ces facteurs au cœur d'une étude n'est pas réalisable. Néanmoins, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), qui a pour rôle d'évaluer les risques sanitaires dans ces domaines, tend à considérer l'effet « cocktail » c'est-à-dire de mélange de composés présents de façon simultanée auquel les espèces animales peuvent être confrontées. Ainsi, lorsqu'un individu est exposé de façon accidentelle (lors de baignade par exemple) à la BMAA, il y a un risque non négligeable pour qu'il soit simultanément exposé aux herbicides les plus massivement utilisés à savoir le glyphosate (GLY) et le glufosinate d'ammonium (GLA). Le GLA est en effet ajouté aux formulations existantes pour contrer les résistances des plants non désirés au glyphosate.

Le travail présenté ici a pour objectif, à l'aide de modèles *in vitro*, de caractériser les effets des polluants sur les cellules du système nerveux. En particulier, ce travail s'est centré sur l'étude de la neurogenèse secondaire (adulte) ainsi que des phénomènes neuro-inflammatoires. Mes travaux de recherches correspondent à une partie d'un projet ANR plus global (ANR NeuroTEM ANR-18-CE34-0006).

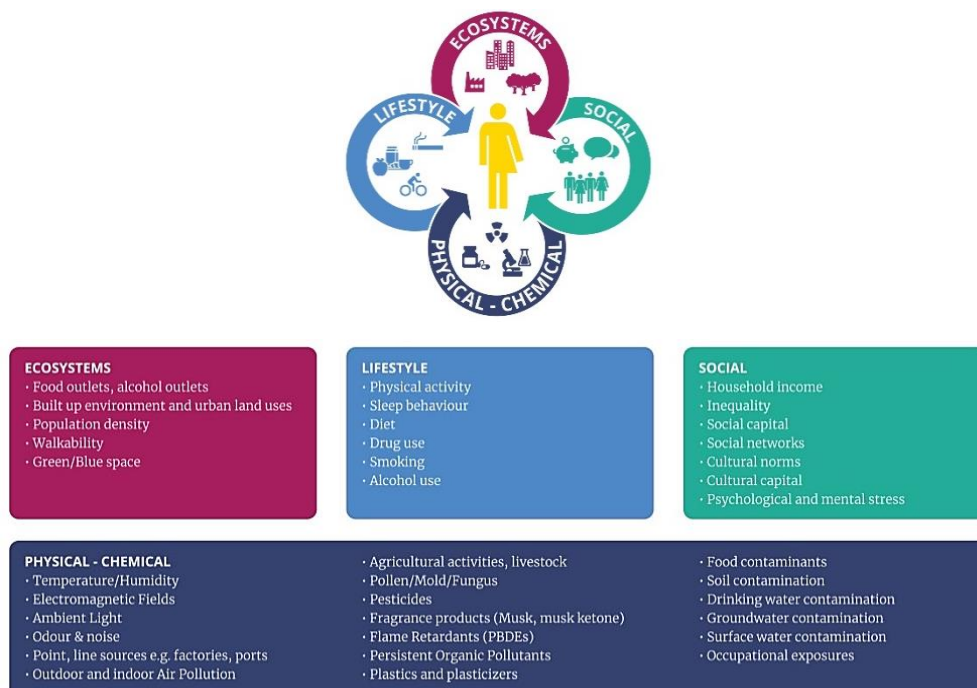


Figure 1 : Représentation des différents facteurs à considérer lorsque l'on tend à considérer l'exposome. Celui-ci se décompose en plusieurs composantes visible ci-dessus (modifié d'après (21)).

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit se divise en quatre parties principales. La première partie, introductive, aborde les thèmes principaux de cette thèse. Elle se divise en trois chapitres. Le premier chapitre est consacré aux molécules étudiées au cours de cette étude : la BMAA ainsi que les herbicides glyphosate et glufosinate d'ammonium. Le deuxième chapitre aborde la neurogenèse secondaire avec un focus sur la zone sous-ventriculaire qui est l'une des principales niches neurogéniques. Enfin, dans le troisième et dernier chapitre de l'introduction les phénomènes neuro-inflammatoires sont présentés et décrits.

La deuxième partie de ce manuscrit correspond aux matériel et méthodes utilisés au cours de cette thèse. Les protocoles de culture, en deux et trois dimensions y sont notamment détaillés. La troisième partie porte sur les résultats que j'ai obtenu dans le cadre ce projet. Ce manuscrit se termine par une discussion des résultats obtenus, en abordant les limites et perspectives de l'étude.

Introduction

Chapitre 1 :

Molécules d'origines naturelles et anthropiques et interactions avec les systèmes glutamatergiques

I) La neurotoxine BMAA

1. Microalgues, cyanobactéries

A) Généralités

Le terme "microalgue" désigne de manière générale les algues microscopiques. Ce sont des micro-organismes, eucaryotes ou procaryotes, uni- ou pluricellulaires et généralement photosynthétiques. Il existe de nombreux embranchements de microalgues eucaryotes. Parmi ceux-ci, les dinoflagellés et les diatomées seraient apparus à la suite d'une ou plusieurs endosymbioses, dont la première fut vraisemblablement entre un hôte eucaryote et une cyanobactérie, fournissant ainsi à ce premier les plastes nécessaires à la réalisation de la photosynthèse (22).

Les microalgues procaryotes regroupent l'ensemble des cyanobactéries qui sont apparus il y a environ 3,5 milliards d'années sur Terre (23). Elles possèdent différents pigments, tels que la phyco cyanine qui leur permet de réaliser la photosynthèse oxygénique. Ce pigment est à l'origine de leur couleur bleutée et leur confère l'appellation "algues bleues". Les cyanobactéries sont majoritairement présentes dans les eaux douces et saumâtres alors que les dinoflagellés et les diatomées sont davantage retrouvés dans l'environnement marin.

B) Prolifération et conséquences

Les microalgues sont l'une des sources majeures d'oxygène à l'échelle planétaire. En tant que producteurs primaires, elles appartiennent au premier maillon trophique des chaînes alimentaires aquatiques. L'élévation de la température et de la présence de nutriments azotés et phosphorés au sein des eaux, marines ou dulcicoles, peut conduire à la formation d'efflorescences algales, également appelés "blooms". Cette prolifération peut menacer l'équilibre des écosystèmes aquatiques et engendrer des impacts environnementaux et sanitaires, notamment en raison de la capacité de certaines espèces à produire des métabolites secondaires ayant une activité biologique nocive, les toxines (24,25). Soulignons également que certaines espèces "d'algues bleues" sont une source importante de produits naturels avec de nombreuses applications dans les secteurs pharmaceutique, alimentaire, agricole ainsi que cosmétique (26). Le rôle de ces toxines au sein des espèces productrices n'est pas toujours élucidé. Il est probable qu'elles aient un rôle protecteur envers elles-mêmes ainsi qu'avec les organismes avec lesquels elles effectuent une symbiose.

C) Les cyanotoxines

Metcalf et al. (27) définissent une cyanotoxine comme « un métabolite produit par une cyanobactérie et qui a une activité biologique nocive dans un environnement donné ou un système donné ». Différentes classes de cyanotoxines ont été répertoriées. Elles peuvent être classées selon leur structure chimiques ou selon leurs modes d'action. Ainsi on distingue, par exemple, les hépatotoxines des dermatotoxines ou encore des neurotoxines. La présence des cyanobactéries et donc celle des cyanotoxines est cosmopolite. En France, les genres toxiques de cyanobactéries qui sont prévalents sont *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Phormidium* et *Woronichinia* (28). Cox et al. (29) estiment que 95% des espèces de cyanobactéries peuvent produire la β -méthylamino-L-alanine (BMAA), qui est l'un des contaminants sur lequel cette thèse se concentre.

2. La β -méthylamino-L-alanine (BMAA)

La BMAA a été découverte en 1967, sur l'île de Guam dans des graines de *cycas micronesica*. Cette découverte fait suite aux investigations recherchant les facteurs environnementaux pouvant expliquer l'incidence élevée d'une maladie neurodégénérative particulière associant la sclérose latérale amyotrophique (SLA) avec des symptômes évoquant des démences Parkinsonienne (*Parkinsonism-dementia complex*, PDC). En effet, sur l'île de Guam, la fréquence de cette SLA, certes atypique, est présente à une fréquence jusqu'à 100 fois supérieure à la moyenne mondiale. Cette maladie neurodégénérative porte ainsi le nom de "SLA-PDC", ou "syndrome de Guam" (30,31).

La BMAA est un acide aminé non protéinogène (Figure 2). A ce jour, trois isomères ont été décrits à : le 2,4-diaminobutyric acid (DAB), la N-(2-aminoéthyl)glycine (AEG) et la β -amino-N-méthylalanine (BAMA) (Figure 2).

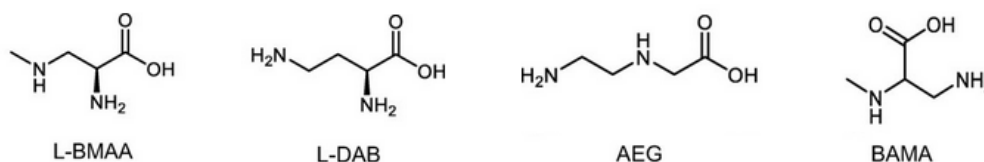


Figure 2 : Structure de la β -N-Méthylamino-L-alanine (BMAA) et ses trois isomères. 2,4-diaminobutyric acid (DAB), N-(2-aminoéthyl)glycine (AEG) et β -aminométhyl-L-alanine (BAMA) (D'après (32)).

Le DAB est un constituant de la paroi de certaines bactéries (33) mais a été rapporté pour la première fois en 2008 au sein de la cyanobactérie *Calothrix* (34).

Les isomères AEG et BAMA ont été mis il y a une dizaine d'années. Ainsi, l'AEG a été mentionnée puis détectée par (35,36) et la BAMA par (37).

Depuis la découverte de la BMAA et de ses isomères, plusieurs organismes ont été identifiés comme “producteurs”. En effet, bien que cette molécule a longtemps été considérée exclusivement comme une cyanotoxine, de nombreuses études suggèrent que d’autres espèces de microalgues sont en mesure de produire la BMAA ainsi que ses isomères.

A) Organismes producteurs

a) Les Cycas et autres végétaux

Certains végétaux sont connus pour leur capacité à produire des acides aminés non protéiques. On peut citer la canavanine analogue de l’arginine, présente dans les graines de certaines plantes comme le trèfle, la luzerne ; la mimosine, similaire à la tyrosine, dans les feuilles et graines de mimosa ; la roténone, elle aussi analogue de la tyrosine et utilisée comme insecticide « naturel » (38). Certaines de ces molécules ont une toxicité non-nulle, et peuvent engendrer des troubles gastro-intestinaux, cardiaques ou encore des lésions rénales chez les mammifères (39). Néanmoins, les organismes producteurs sont parfois difficilement identifiables du fait qu’ils peuvent être en symbiose avec des cyanobactéries, qui sont les réels producteurs (40).

De nombreuses études ont confirmé la présence de BMAA dans les graines de cycas (34,41–44). Les espèces concernées sont *Cycas micronesica* (43), *Cycas revoluta* (45,46) et *Cycas debaoensis* (47). Les isomères DAB, AEG et BAMA ont également été détectés dans *Cycas debaoensis* (47). Le DAB a été aussi rapporté dans de nombreuses espèces d’angiospermes tels que *Lathyrus latifolius* et *Brassica oleracea* (45,48) ainsi que dans certaines plantes aquatiques (49).

b) Les cyanobactéries

La présence de BMAA dans une cyanobactérie symbiotique diazotrophe (i.e. *Nostoc sp.*) isolée à partir des racines d’un Cycas (Figure 3), a été à l’origine du regain d’intérêt pour la BMAA en tant que facteur environnemental pour les cas sporadiques de maladies neurodégénératives (MND).

La production de la toxine BMAA par les cyanobactéries est très probablement liée à son environnement (50) Plusieurs facteurs peuvent être proposés tels que la température (51) la teneur en azote dans le milieu (52), l’intensité lumineuse (53) ainsi que de la phase de croissance dans laquelle se situe l’organisme (54).

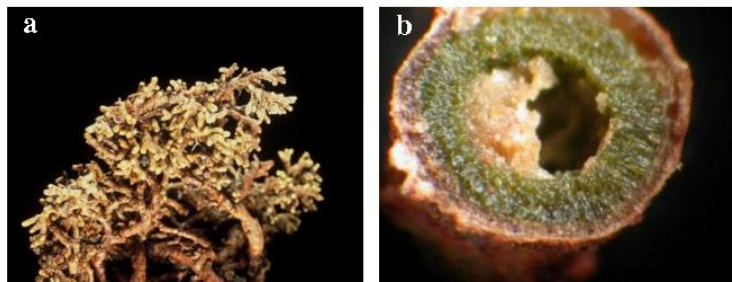


Figure 3: Cyanobactéries et cycas. (a) photographie des racines coralloïdes de *cycas micronesica* ; (b) présence de cyanobactéries dans les racines de cycas (d'après(42)).

Cox et collaborateurs ont proposé l'hypothèse que la production de BMAA pourrait être une caractéristique commune des cyanobactéries. En effet, parmi les 41 souches choisies de cyanobactéries criblées, 95% des souches produiraient la toxine. La concentration de BMAA rapportée varie de façon importante selon l'espèce étudiée (jusqu'à 6700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec) (29,55). L'accès à de nouvelles techniques analytiques a amené à nuancer les résultats de l'équipe de Paul Cox. Plusieurs études successives ont fait état de l'absence de BMAA au sein d'espèces cyanobactériennes décrites comme productrices (48,56,57). Ce constat a entraîné des débats autour des méthodes utilisées dans les études précédentes, notamment en termes de spécificités des molécules identifiées (40). Certaines souches de cyanobactéries ont néanmoins été validées par l'ensemble des études comme productrices de BMAA, notamment : *Nostoc sp.* et *Leptolyngbya* (58–60). Concernant les isomères de la BMAA, le DAB a été observé à de nombreuses reprises (34,45–48,60). L'AEG, bien que moins étudié, a été également rapporté dans quelques souches (36,47,59,60). Il est nécessaire de garder à l'esprit que la production de la BMAA, ainsi que celle de ses isomères, dépend du contexte environnemental.

c) Microalgues

D'après l'IFREMER, à l'échelle mondiale environ 175 espèces de microalgues sont considérées toxiques pour l'Homme ou nuisibles pour la biodiversité marine. A l'instar des cyanobactéries, la présence de certaines espèces est à l'origine de fermetures temporaires de zones conchylicoles et de baignades. En France, de nombreuses familles de microalgues productrices de toxines sont surveillées. La plus répandue étant *Dinophysis* qui émet des toxines diarrhéiques. L'étang de Thau, et certaines régions de Bretagne sont touchées par de telles algues et, de fait, leur(s) toxine(s). Une étude de 2016 a étudié différents compartiments trophiques de l'écosystème de l'étang de Thau (61). Ces recherches ont mis en évidence une augmentation de BMAA et de l'un de ses isomères, le DAB entre les niveaux trophiques inférieur et supérieur, appuyant ainsi l'hypothèse que la bioaccumulation de BMAA et de DAB est bel et bien effective, ici au sein des moules de l'étang de Thau (Figure 4). La communauté phytoplanctonique

de cet écosystème est non pas dominée par les cyanobactéries, mais par les microalgues en particulier les diatomées.

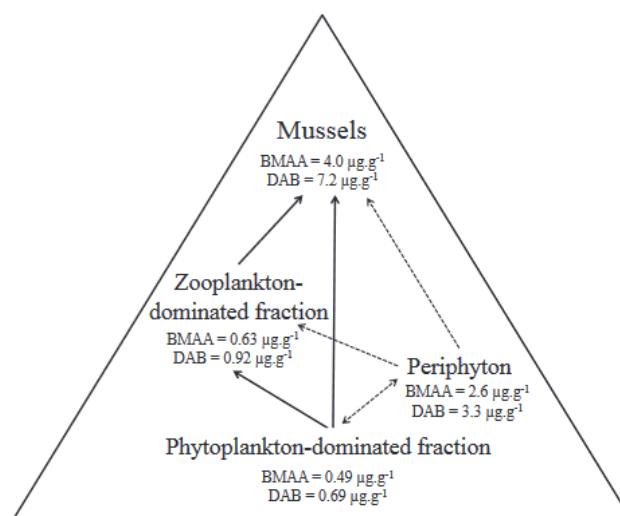


Figure 4: Voie de bioaccumulation hypothétique au sein de l'écosystème de l'étang de Thau. Les concentrations moyennes de BMAA total et de DAB sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de poids sec. Les flèches pleines représentent les liens trophiques envisagés tandis que les flèches pointillées représentent les liens non confirmés (d'après (61)).

- Diatomées

Les diatomées, ou *Bacillariophyta*, sont un groupe d'algues représentant 40 % de la production primaire dans l'océan aujourd'hui (62). Étymologiquement, le mot « diatomée » provient du grec *diatom* « couper en deux ; séparer ; diviser », en référence au frustule de ces organismes, enveloppe siliceuse formée de deux valves emboîtées. En raison de leur abondance dans la communauté phytoplanctonique marine, en particulier dans les zones riches en nutriments des océans du monde, les diatomées représentent probablement jusqu'à 20 % de la fixation photosynthétique mondiale du carbone. La production de toxines par les diatomées a été signalée pour la première fois dans les années 1980, lorsqu'il a été découvert que le genre de diatomées marines et estuariennes *Pseudo-nitzschia* produisait l'acide domoïque, un acide aminé neurotoxique (63). Jusqu'à récemment, l'acide domoïque était considéré comme la seule toxine produite par les diatomées, mais plusieurs études ont mis en évidence la production de BMAA et de ses isomères par les diatomées marines (55,61,64). Ainsi, une dizaine de souches de diatomée ont été identifiées comme productrices de la BMAA. Les espèces productrices sont répertoriées dans le tableau 1.

- Dinoflagellés

Les dinoflagellés appartiennent au plancton d'eau douce et marine. Étymologiquement, le mot *Dinoflagellata*, provient du grec *"dinos"*, « tournoiement », et du latin *flagellum*, « fouet »,

littéralement « flagelle tournoyant ». Certaines espèces sont chlorophylliennes ; les espèces dépourvues de pigments photosynthétiques se nourrissent de plancton. Certaines formes, telles que *Noctiluca miliaris* et *Noctiluca scintillans* peuvent être bioluminescentes. *Noctiluca scintillans*, connue sous le nom de « scintillement de la mer », peut émettre une lueur bleue visible la nuit (Figure 5). Les efflorescences peuvent être mortelles pour les espèces présentes.



Figure 5: *Noctiluca scintillans*. (a) *Noctiluca scintillans* avec présence de *Gymnodinium catenatum*, une autre espèce de dinoflagellés, englouti dans les vacuoles digestives. D'après (65). Barre d'échelle = 100µM. (b) Blooms de *Noctiluca s scintillans* dans la mer de Chine orientale (d'après (66)).

Plusieurs espèces de dinoflagellés ont été reportées comme productrices de BMAA et, parfois, de ses deux isomères. Les espèces productrices de BMAA ainsi que des isomères sont répertoriés ici (Table 1). Seules les publications récentes, utilisant des méthodes de détection fiable car sélectives ont été référencées.

	Espèces	Isomères			Référence
		BMAA	AEG	DAB	
	<i>Leptolyngbya sp.</i>	✓	✓	✓	(45,59)
	<i>Nostoc sp.</i>	✓		✓	(58)
Dinoflagellés	<i>Gymnodium catenatum</i>	✓			(67)
	<i>Heterocapsa triquetra</i>	✓	✓	✓	(64)
	<i>Achnanthes sp.</i>	✓	✓	✓	(64)
	<i>Aulacoseira sp.</i>	✓	✓	✓	(60)
Diatomées	<i>Chaetoceros sp.</i>	✓		✓	(68)
	<i>Coscinodiscus sp.</i>	✓			(55)
	<i>Cyclotella sp.</i>	✓		✓	(60)
	<i>Fragilaria sp.</i>		✓	✓	(60)
	<i>Navicula sp.</i>	✓	✓	✓	(60,64)
	<i>Phaeodactylum Tricornutum</i>	✓		✓	(67,68)
	<i>Skeletonema sp.</i>	✓	✓	✓	(64)
	<i>Tabellaria sp.</i>	✓	✓	✓	(60)
	<i>Thalassiosira sp.</i>	✓	✓	✓	(64,68)

Table 1: Liste non exhaustive des espèces de cyanobactéries et des microalgues (dinoflagellés et diatomées) décrites comme produisant la BMAA et isomères.

La production de toxines dépend du contexte environnemental ainsi que de la variabilité génétique. Or entre des souches d'une même espèce, celle-ci peut être importante. C'est pourquoi toutes les souches d'une même espèce ne produisent pas *de facto* la BMAA ou l'un de ses isomères.

B) Production de BMAA et rôle écophysologique au sein des microalgues

a) Voie de biosynthèse

Identifier les voies de biosynthèse et les fonctions de la BMAA chez les cyanobactéries demeure difficile. Cette toxine est présente sous forme libre et sous deux formes liées (57,62,69,70). Les complexes chimiques dans lesquels la BMAA est incorporée demeurent méconnus. Dès 2003 il a été proposé que la synthèse de BMAA dépendrait de l'acide 2,3-diaminopropionique (DAP) (71,72). Cette molécule, considérée également comme un acide aminé non protéinogène est synthétisé à partir de la S-O-acétylsérine, de la phosphosérine, de la cystéine ou de la 3-cyanoalanine et de l'ammonium. La réaction est catalysée par une enzyme de type cystéine synthase (Figure 6).

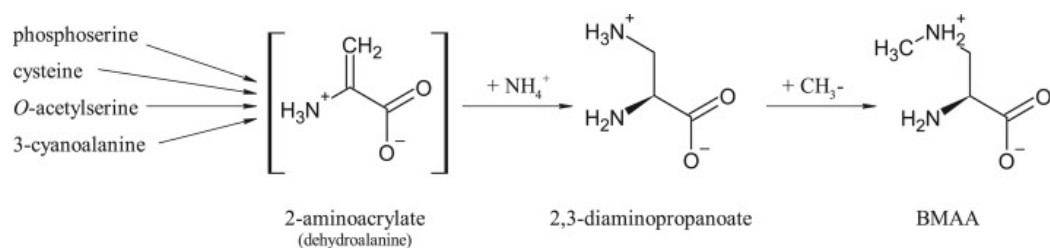


Figure 6: Voie biochimique proposée pour la synthèse de la BMAA. Une enzyme de type cystéine synthase catalyse la synthèse du DAP. Un intermédiaire probable dans cette réaction est le 2-aminoacrylate. La S-adenosyl-S-méthionine confère le groupe 3-N-méthyle au 2,3-diaminopropanoate, donnant BMAA. (71)

Basé sur le génome de 130 cyanobactéries, une récente étude indique que la synthèse du DAP dépendrait de la présence des gènes SbnA et SbnB (73). Cependant, il est également possible que les cyanobactéries synthétisent la BMAA par une ou plusieurs voies qui demeurent à être découvertes. Les voies de biosynthèse de la BMAA et ses isomères ne sont donc pas encore complètement élucidées. De plus, à l'heure actuelle il n'y a pas de consensus sur les souches de cyanobactéries produisant de la BMAA. Sa production confirmée par les diatomées *Thalassiosira sp.* et *Phaeodactylum tricorutum* est particulièrement intéressante pour l'étude de sa biosynthèse puisque les génomes de ces diatomées ont été séquencés (74,75).

b) Facteurs influençant la production et la libération de BMAA

A l'instar d'autres cyanotoxines, la BMAA est probablement présente dans la région nucléoplasmique, la zone thylakoïde ainsi que la paroi cellulaire des cyanobactéries (69). En plus de la biosynthèse *de novo* de la BMAA, les cyanobactéries peuvent absorber la BMAA exogène de l'environnement (58,76). Ainsi,

les cellules de cyanobactéries mortes ou endommagées lysent et libèrent la toxine dans l'environnement. Les facteurs de stress abiotiques pouvant conduire à la lyse cellulaire comprennent un éventuel stress nutritionnel dû à un excès ou une carence en phosphore ou en fer (77–79), un stress salin (80) un stress lumineux et le stress oxydatif (78). Les facteurs de stress biotiques peuvent être notamment induits par des infections virales (81).

Aujourd'hui, il est admis que dans des conditions déficientes en azote (N), les cyanobactéries non fixatrices de N₂ et fixatrices de diazote peuvent synthétiser la BMAA (82) Cependant, dans un environnement limité en azote, les cyanobactéries non fixatrices de diazote produisent plus de BMAA que les cyanobactéries fixant le N₂ (79,82,83). Il a été proposé que si la BMAA était plus difficilement détectable en laboratoire que sur le terrain, c'est en partie en raison du manque d'azote dans les milieux de culture de cyanobactéries (57,76). Basée sur des relevés réalisés au Canada, une proposition de dynamique entre la production de BMAA et les blooms de cyanobactérie a été schématisée (Figure 7).

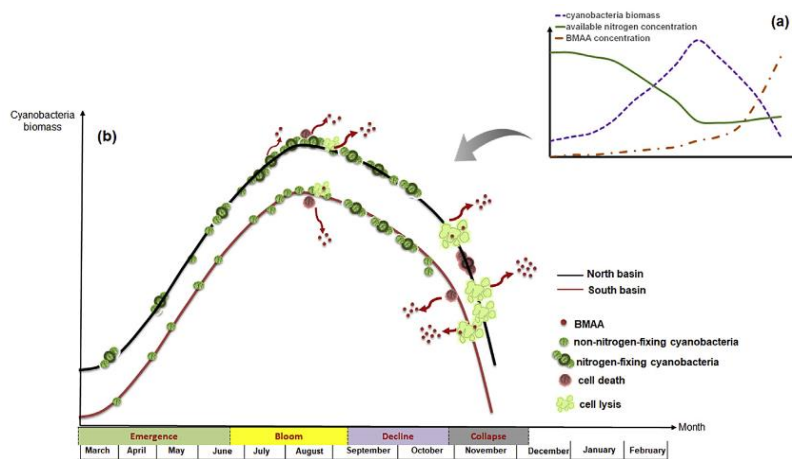


Figure 7: Représentation des dynamiques entre la production de BMAA et les efflorescences de microalgues, ici les cyanobactéries. (a) Relation hypothétique entre la concentration d'azote disponible, la biomasse des cyanobactéries et la production de BMAA ; (b) Relation entre la production de BMAA et développement d'efflorescences algales nuisibles cyanobactériennes composées de cyanobactéries non fixatrices de diazote et de cyanobactéries fixatrices de N₂ dans le bassin Nord et Sud du lac Winnipeg, au Canada (83).

Ainsi, l'un des facteurs majeurs indiscutables contribuant à l'abondance des microalgues est l'augmentation des activités anthropiques. Parmi celles-ci, la pratique qui semble avoir l'impact le plus important semble être l'eutrophisation, c'est-à-dire le rejet accru de composés nutritifs dans les masses d'eau. Ceux-ci sont principalement représentés par le phosphore et l'azote (84). L'augmentation des nutriments conduit à une prolifération importante d'algues potentiellement nocives dans les lacs, les rivières et les eaux marines (85). Il a été démontré que le réchauffement de la planète contribue fortement au développement des cyanobactéries (86). De nombreuses études ont démontré que lors des épisodes de prolifération, les cyanobactéries peuvent produire des toxines à différents degrés, ce qui représente un risque pour les populations exposées (87,88).

c) Rôle écophysologique de la BMAA au sein des organismes producteurs

La compréhension des fonctions de la BMAA dans les organismes peut fournir un éclairage sur ses possibles interactions avec des mécanismes physiologiques d'autres organismes expliquant sa toxicité. La synthèse de la BMAA a un coût énergétique. Aussi, il doit y avoir un avantage évolutif pour les microalgues ayant conservé la capacité de biosynthèse du BMAA. D'un point de vue écologique, cette molécule peut assurer la niche fonctionnelle de l'organisme (avantage écologique) ainsi que l'amélioration de son efficacité physiologique (*fitness* écologique). Plusieurs rôles écologiques et physiologiques du BMAA pour les cyanobactéries ont été proposés.

- Interactions interspécifiques

La disponibilité d'azote joue un rôle essentiel dans la production de BMAA par les cyanobactéries (76,89). Selon les espèces, la présence de BMAA peut permettre à une espèce de cyanobactérie de « prendre le dessus » sur une autre. En effet, la BMAA bloque l'activité de la nitrogénase et limite la croissance des cyanobactéries fixatrices de N₂, réduisant ainsi la taille de leur population et libérant des ressources telles que l'espace et l'oxygène nécessaires à la population de cyanobactéries non fixatrices de N₂. De plus, les cyanobactéries possèdent des adaptations physiologiques qui leur permettent de bioaccumuler et de séquestrer la BMAA dont la concentration est inférieure à un seuil (méconnu) dans ses organites afin d'éviter les effets toxiques (83). Cela explique en partie la coexistence de cyanobactéries non fixatrices de N₂ et fixatrices de N₂ dans les environnements d'eau douce, malgré la capacité des deux groupes à produire du BMAA. Il est en effet probable que chaque groupe se soit adapté à la pression sélective de la molécule BMAA et a développé des stratégies pour maintenir sa niche fonctionnelle après des millénaires d'évolution commune.

- Molécule "signal" :

L'acide γ -aminobutyrique (GABA), structurellement proche de la BMAA, est une molécule de signalisation protégeant les espèces productrices. Le GABA permet notamment à certaines plantes de se protéger contre les phytophages ou d'initier des voies de défense contre les phénomènes de sécheresse (90,91). Considérant leur proximité structurelle, la BMAA pourrait avoir des caractéristiques physiologiques voisines pour les espèces productrices.

o Mort cellulaire programmée (*Programmed cell death, PCD*) et régulation des populations

Les cyanobactéries initient la PCD dans des conditions environnementales stressantes (92). Ce sont les métacaspases qui initient une dégradation ciblée des protéines dans les voies apoptotiques de la PCD (93). La présence de BMAA exogène est une indication que les cellules de cyanobactéries entrent en

mort cellulaire et sont lysées par des facteurs de stress abiotiques et biotiques, comme décrit précédemment. Ainsi, il est proposé qu'une augmentation de la concentration exogène de BMAA pourrait induire l'expression de gènes de métacaspase et initier la PCD en tant que rétroaction négative pour contrôler la taille des populations de cyanobactéries.

o Régulation de la photosynthèse :

Les cyanobactéries sont des organismes photosynthétiques. De ce fait, elles doivent protéger leur appareil photosynthétique des dommages photo-oxydatifs. Il est possible que la BMAA participe à cette protection. En effet, chez *Arabidopsis*, la BMAA agit comme un agoniste des récepteurs du glutamate qui affecte le potentiel de membrane cellulaire, modifiant ainsi la transduction du signal lumineux (94). Or, le récepteur du glutamate d'*Arabidopsis* est hautement homologue avec le même récepteur chez la cyanobactérie *Synechocystis sp.*, ce qui appuie l'hypothèse de contrôle (95). Il est ainsi suggéré que la BMAA limite les dommages oxydatifs. D'une part, cette molécule bloquerait la transduction du signal sous une intensité lumineuse élevée et une disponibilité limitée en azote (96). D'autre part, elle participerait à dissiper le rayonnement lumineux avant qu'il n'endommage le chloroplaste, ou pour inhiber l'activité de la chlorophylle a (58).

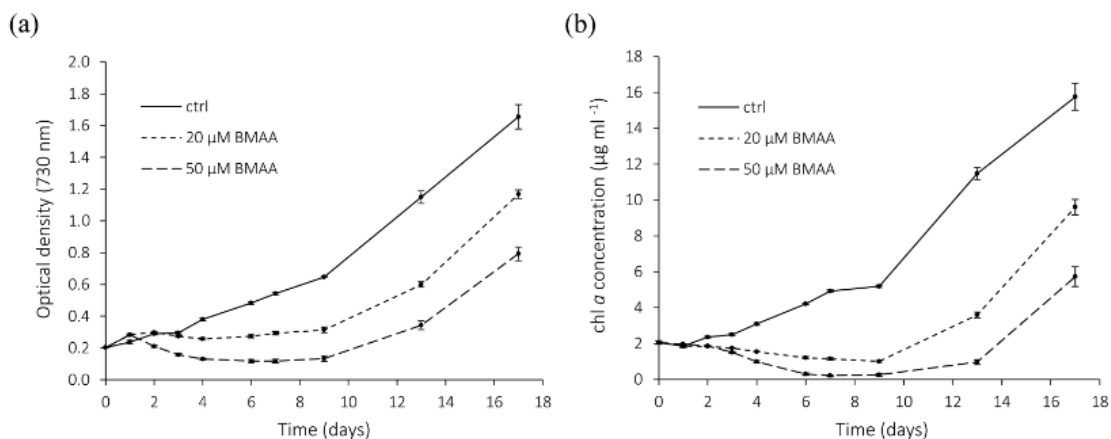


Figure 8: Contrôle de la population de *Nostoc 7120* par la BMAA. Les cultures cellulaires ont été suivies pendant 18 jours en l'absence (ctrl) ou en présence de 20 ou 50 µM de BMAA. Pour évaluer les effets à long terme du BMAA sur la croissance de *Nostoc 7120*, la densité optique (DO) à 730 nm, qui sert d'indicateur de la densité cellulaire, et la concentration de chl a ont été surveillées pendant 18 jours. Les graphiques illustrent les valeurs moyennes ± SE ; n = 5. (a) DO à 730 nm. (b) Concentration de Chl a (µg/mL) (58).

o Métabolisme de l'azote

La BMAA a des fonctions physiologiques importantes qui participent à l'intégrité des cyanobactéries dans des conditions de carence en azote. Cela implique que les cyanobactéries ont des mécanismes cellulaires pour réassimiler la BMAA "stockée". Ainsi, les rôles écophysologiques de la BMAA commencent à être bien connus chez les cyanobactéries. Chez les microalgues eucaryotes, c'est-à-dire certaines espèces de diatomées et dinoflagellés, les recherches sont récentes. En 2022, Kim et al. ont

investigé le rôle de la BMAA au sein de deux diatomées : *Phaeodactylum tricornutum* et *Thalassiosira pseudonana* (97,98). Dans ces études, ils identifient que le rôle de la BMAA chez ces microalgues semble être similaire à ceux des espèces cyanobactériennes.

C) Etude de toxicité de la BMAA

La BMAA est produite par certaines espèces de microalgues et de cyanobactéries. Ces espèces sont des producteurs primaires c'est-à-dire qu'elles constituent le premier maillon de la chaîne trophique. Considérant la capacité de la BMAA de se bioaccumuler jusqu'aux consommateurs secondaires et tertiaires, auxquelles l'espèce humaine appartient, nous nous sommes intéressés à la toxicité de la BMAA *in vitro*, *in vivo* ainsi que chez l'être humain.

a) *In vitro*

Parmi les effets reportés dans la table 2, il est intéressant de noter la mise en évidence d'une altération mitochondriale au sein des cellules de Purkinje du cervelet, une structure cérébrale fortement impliquée dans les fonctions motrices. De telles altérations ont été associées chez les rats à des niveaux protéiques accrus de GSK-3 et de TDP-43 (99). Ces altérations mitochondriales peuvent être associées à des modifications/perturbations de la synthèse protéique. Un impact sur la synthèse des protéines a en effet été démontré par plusieurs travaux. Dunlop et al. (100) ont rapporté que la BMAA pourrait être mal incorporée dans les protéines humaines à la place de la L-sérine. Dans ce cas de figure, on parle de « *misfolding* ». Cette donnée a été appuyée par une expérience *in vivo* menée chez des rats (101)(Table 3), où la toxicité suite à l'administration de BMAA a été partiellement prévenue par l'administration concomitante de sérine. Par ailleurs, ils ont étudié les effets de la BMAA sur le fonctionnement enzymatique (Table 2) ; ils ont constaté que la BMAA réduisait significativement l'activité de la β -amylase, de la catalase et de la GST. Or, ces enzymes permettent de détoxifier l'organisme des composés endogènes ou xénobiotiques. Par ailleurs, l'activité d'autres enzymes telles que la peroxydase (protection contre les dommages oxydatifs), SOD (protection contre les espèces réactives de l'oxygène ROS) n'était pas réduite. De plus, la neurotoxicité de la BMAA pourrait également s'expliquer par sa capacité à inhiber la synthèse de la mélatonine, qui est un peptide neuroprotecteur (102). Il a été récemment démontré que l'inhalation de BMAA pourrait affecter le cerveau, via la région du bulbe olfactif (103) perturbant le réseau des neurites et réduisant la viabilité cellulaire, notamment via les mécanismes glutamatergiques. Les mécanismes de neurotoxicité de la BMAA ne sont pas complètement compris, mais de plus en plus d'études positionnent la BMAA comme un agoniste des récepteurs du glutamate (104).

b) *In vivo*

Depuis que la BMAA a été identifiée en 1967, de nombreuses études ont été réalisées *in vivo* afin de déterminer si la BMAA pouvait être un potentiel facteur étiologique de maladies neurodégénératives (MND). La plupart d'entre elles étudient la BMAA en toxicité aiguë. Les individus ont été exposés une seule fois, à une forte dose. Les études de toxicité aiguës sont ainsi distinguées des études chroniques et subchroniques en fonction de leur durée. Les intervalles de durée de chaque type d'exposition varient selon les espèces et leur durée de vie. Selon l'INERIS, chez l'Homme, l'exposition aiguë correspond à une exposition de quelques secondes à quelques jours, l'exposition subchronique à une exposition de quelques jours à quelques mois et l'exposition chronique à une exposition de quelques années à la vie entière.

Les études de toxicité *in vivo* ont été résumées dans la table 3. Les principaux effets observés sont les dysfonctionnements moteurs, des déficits cognitifs tels que les altérations de l'apprentissage et de la mémoire ainsi qu'une hyperactivité. Or, le dysfonctionnement moteur est l'un des principaux signes de la SLA. Cela a été observée chez le rat, la souris, et des primates non-humains (PNH, table 3). Plusieurs études citées ici ont mis en évidence la capacité de la BMAA à avoir un impact sur les fonctions cérébrales à l'âge adulte après exposition embryonnaire ou néonatale, suggérant que la BMAA pourrait agir en tant que neurotoxine développementale. Karlsson et al. (105) ont démontré que la BMAA peut s'accumuler dans le cerveau des fœtus et des nouveau-nés chez les souris et les rats. Ils rapportent une altération des capacités locomotrices ainsi qu'une hyperactivité. Cela questionne sur les conséquences, chez l'Homme, d'une exposition maternelle pendant la grossesse. De plus, il a été démontré chez le rat que la toxine était présente dans le lait, et de ce fait, transmise lors de l'allaitement à la progéniture (106). Par ailleurs, la fenêtre d'exposition embryonnaire à la BMAA est capitale. En effet, les conséquences d'une exposition réalisée à E15,5 ont été supérieures à ceux observées lorsque l'exposition fut à 13,5, aux critères étudiés. Ils rapportent notamment une perturbation de la neurogenèse et une prolifération plus importante des cellules microgliales qui débutent leur colonisation également à E15,5 (Feat-Vetel, équipe de F. Boussin, CEA). Par ailleurs, une exposition néonatale peut conduire à une modification du métabolisme de l'énergie et des acides aminés, affectant ainsi les fonctions cérébrales adultes (107).

Espèces	Type cellulaire	Concentrations	Temps	Effets observés	Références
Souris	Neurones moteurs (embryonnaires)	30µM	20 – 24h	Augmentation [Ca2 +] intracellulaire ; génération de ROS, activation des récepteurs AMPA/kainite à 0,03 mM	Rao et al., 2006
	Culture primaire de cellules souches embryonnaires	500µM – 10mM	24h	Augmentation des phénomènes apoptotiques (marquage CC3) de façon concentration-dépendante dès 500µM ; baisse de la prolifération cellulaire (marquage Ki67) ; génotoxicité significative à 1mM	Feat-Vetel et al., CEA (<i>en cours de publication</i>)
	Cellules gliales et neuronales (embryonnaires)	0.1 à 10µM	24h	Neurotoxicité concentration-dépendante	Rush et al., 2012
	Cellules neuronales	De 0.1 à 3mM	2 – 3h	Baisse activité PP2A	Arif et al., 2014
	Macrophages Glioblastome	1nM – 0.1µM – 10µM	24 – 48 – 96h	Augmentation de la mort cellulaire (+20%)	Takser et al., 2016
	Cellules gliales et neuronales	0.025µCi/mL	2h	Activation des mGluR5	Albano et al., 2018
	Cultures neuronales	3mM	6 – 24 – 48h	Activation de l'immunité innée ; dysfonction mitochondriale ; phosphorylation de la protéine Tau ; oligomères Aβ	Silva et al., 2020
	Bulbes olfactifs	50µM – 0.5mM	24h	Perturbations du réseau neuronal, réduction de la viabilité cellulaire	Pierozan et al., 2020
Rats	Cellules neuronales et gliales	De 10µM à 3mM	24h	Activation des mGluR5 ; stress oxydatif ; effets AEG > BMAA	Schneider et al., 2020
	PC-12 (phéochromocytome)	3.6µM – 0.1mM	48h	Augmentation de l'expression des mGluR1 ; Augmentation de la nécrose et de l'apoptose	Van Onselen et al., 2018
	NSCs (striatum) et neuronales	50µM – 3µM	24h	La prolifération des NSCs réduite. La différenciation cellulaire (astrocytes, oligodendrocytes, neurones) est réduite via des mécanismes glutamatergiques	Pierozan et Karlsson., 2019
	NSCs (hippocampe)	50µM – 100µM		Les cellules souches sont plus sensibles à la BMAA que les cultures primaires de neurones ; Effets persistants peut être lié à des altérations épigénétiques qui interfèrent avec la programmation des cellules souches neurales (réduction de la méthylation globale de l'ADN)	Pierozan et al., 2020
	C6 (glioblastome) ; mimerait les cultures primaires d'astrocytes	de 100µM à 500µM	24h	Effets sur les fonctions astrocytaires ; production de ROS (stress oxydatif) ; diminution des défenses anti-oxydantes (baisse du glutathion et de la superoxyde dismutase) ; Perturbation du métabolisme du glutamate ; Effets neuro-inflammatoires	Pereira et al., 2022
Humain	SH-SY5Y (glioblastome) NT-2 (CNS précurseurs neuronaux) SK-N-MC (tumeur neuroectodermique primitive)*	De 1µM à 10mM	5 jours	Mort neuronale	Lee et al., 2012
	MRC-5 (fibroblastes) SH-SY5Y (glioblastome) HUVECs (endothéliale)	31.25mM	2 – 4 – 16h	Mauvaise incorporation dans les protéines (sérine)	Dunlop et al., 2013
	SH-SY5Y (glioblastome) HEK-293 (reins)	De 9µM à 5mM	24 – 48 – 96h	Réduction de la viabilité cellulaire ; augmentation de l'activité des caspases 3, 7 et 12 ; stress oxydatif	Okle et al., 2013
	Glioblastome	0.5mM	72h	Stress du réticulum endoplasmique (problème de protéines « misfoldées ») ; augmentation de l'activité des caspases 3	Main et al., 2016
	SH-SY5Y (glioblastome)	De 0.5 à 4mM	24 – 48 – 96h	Mort neuronale	Potjewyd et al., 2017
	SH-SY5Y (glioblastome)	0.5mM	48h	La BMAA et le DAB augmente l'activité des caspases 3 ; les isomères DAB et AEG seuls n'ont pas de toxicité aux paramètres étudiés	Main et al., 2018

Table 2 : Evaluation de la toxicité in vitro de la BMAA et de ses isomères. BMAA : β-N-méthyl-amino-L-alanine ; BMAA.HCl : chlorhydrate de β-N-méthyl-amino-L-alanine ; DAB : acide 2,4-diaminobutanoïque ; AEG: N-(2-aminoethyl)glycine ; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; NSCs : neural stem cells. *SK-N-MC was originally thought to be a neuroblastoma cell line but shown to be from an Askin tumor (Adapté de (108)).

Organisme, âge	Dose(s)	Voie d'exposition	Effets	Références
Rats, juvéniles	0.71–1.7 mg/g	i.p	Atteinte comportementale	(69)
Macaques	100 à 315mg/j/kg ≤ 12 semaines	Orale	Problème de motricité, symptômes de type parkinsoniens	(14)
Souris, néonatal	0.05mg 1mg	i.c.v	Dysfonction de la motricité Hyperactivité, dysfonction motrice	(14)
Souris, 2 mois	500mg/kg/j	11 semaines	Aucune atteinte comportementale	(109)
Rats, n.p	678 × 10 ⁻³ mg/g	i.p	Dysfonction motrice ; hyperactivité	(110)
Souris, n.p	0.15 – 1.5mg	i.c.v	Dysfonction motrice	(111)
Rats, juvéniles	39x10 ⁻⁶ – 91x10 ⁻⁶ mg/kg	i.p	Dysfonction motrice	(112)
Rats, adultes	0.5mg/jour	i.c.v jusqu'à 60j	Dysfonction motrice	(113)
Rats, n.p	0.5mg/jour	i.c.v jusqu'à 10j	Dysfonction motrice	(114)
Rats, PND9	200 – 600mg/kg	s.c ; 2 jours	Dysfonction motrice ; Passage de la BHE ; Hyperactivité	(105)
Rats, PND9-10	200 – 600mg/kg	s.c ; 2 jours	Atteinte cognitive à l'âge adulte	(105)
Rats, PND9-10	50, 200, 600mg/kg	s.c ; 2 jours	Mort neuronale (hippocampe) à la dose la plus forte Atteinte cognitive (âge adulte)	(115)
Rats, nouveaux-nés	460mg/kg	s.c	Mort cellulaire, astrogliose, troubles de l'apprentissage et de la mémoire à l'âge adulte, agrégation des protéines	(116)
Rats, PND21	300mg/kg	i.p ; 5 jours	Mort neuronale	(117)
Souris ; 6 mois	28mg/kg/j	Orale ; 30j	Aucune atteinte motrice ou cognitive	(118)
Souris, 12-14 sem.	100mM	Injection intra crâniale	Mort neuronale	(119)
Rat, adultes	300 mg/kg	i.v ; De 2 à 8 semaines	Atteinte mitochondriale ; astrogliose ; perte de motoneurones avec accumulation de TDP-43 ; surexpression des cytokines pro-inflammatoires et de NF- κB.	(120)
Rat, adultes	300mg/kg/j	i.p ; 5 jours	Atteinte du cervelet ; augmentation des biomarqueurs de la SLA (TDP-43, GSK3)	(99)
Rat	400mg/kg/j	s.c	Chez les PND3, 4, et 5 : troubles comportementaux (atteinte motrice). Atteinte olfactive (symptôme précoce de la MP), Atteinte mnésique ; réduction de l'activité motrice et de l'activité exploratoire.	(121)

Rat et souris	1, 10, 100mg/kg	orale ; 1, 5, ou 10 jours	Principale voie d'excrétion : CO ₂ expiré (46-61 %) avec 7-13 % et 1,4-8 % de la dose administrée excrétée dans l'urine et les fèces, respectivement Toxine distribuée et accumulée de façon dose/dépendante dans l'ensemble des tissus, dont le cerveau. Pas de différence interespèces ni genre-dépendant	(122)
Rat, PND10	460mg/kg	s.c ; 2 jours	Absorption sélective dans la glande pinéale 30 minutes à 24 heures après l'administration de BMAA radiomarquée ; inhibition de la synthèse de mélatonine	(123)
Rat, PND3	50mg/kg - 100mg/kg	s.c	Altérations comportementales (atteinte motrice) ; dépôt de plaques bêta-amyloïdes ; perte neuronale dans l'hippocampe de rats adultes. Symptômes neurodégénératifs ; symptômes cliniques évoquant la SLA, ainsi que la maladie de Parkinson.	(124)
Rat, PND5	400mg/kg	s.c	Dysfonction motrice ; perte neuronale	(101)
Souris	50mg/kg	Via leur mère (intranasale) lors de la période gestationnelle (différents temps)	Augmentation des phénomènes apoptotiques lorsque traitement réalisé à E15.5 ; absence d'effet à E13.5. Lors d'un traitement chronique tous les deux jours dès E10.5 jusqu'à E14.5 : perturbation de la neurogenèse ; Prolifération des cellules microgliales.	Feat-Vetel et al., CEA (<i>en cours de publication</i>)

Table 3 : Etudes de la toxicité *in vivo* de la BMAA ou de ses isomères chez les rongeurs (rat, souris) et les primates non-humains. *n.p.* : non précisé. *i.v.* : intraveineuse ; *i.c.v.* : intracérébroventriculaire ; *s.c.* : sous-cutané ; *PND* : jours postnataux ; *i.p.* : intrapéritonéal.

c) Chez l'être humain

Des études établissent un lien entre la présence de la neurotoxine et les MND. Ce lien semble particulièrement fort concernant la SLA/PDC. En effet, la BMAA a été détectée dans le tissu cérébral post-mortem de personnes décédées de la SLA ou de la maladie d'Alzheimer (MA). Elle n'a pas été détectée au sein de patient atteint de la maladie de Huntington (MH), ni des patients témoins (125). Considérant les études *in vivo* précédemment évoquées (Table 3), les études épidémiologiques s'intéressant aux clusters de SLA pourraient porter une attention particulière à l'exposition maternelle ayant eu lieu pour comprendre l'étiologie de troubles neurodégénératifs.

Echantillon	Substance d'intérêt recherchée	Mesures	Pathologies	Méthode de détection	Référence
Cerveau	BMAA	3 à 10 µg/g (forme libre) et 149 à 1 190 µg/g (forme liée) chez 83 % et 100 % des patients Chamorro SLA/PDC respectivement - Détecté chez deux patients atteints de MA (3,4 à 264 µg/g). Présence chez un patient asymptomatique 4,8 à 82 µg/g	SLA/PDC Alzheimer	LC-MS	(62)
Cortex frontal	Protéine Tau	Augmentation des niveaux de Tau et de sa phosphorylation	8 MP		(126)
Cerveau	BMAA	De 331 à 256µg/g de BMAA au sein de 13 patients ALS ; de 10 à 228µg/g au sein de patients AD ; pas de détection au sein des personnes atteintes de HD	13 SLA 12 MA 8 MH	HPLC LC/MS-MS	(125)
Cerveau	BMAA	627µg/g présent chez 6 patients ALS ; 82µg/g présent chez un individu Chamorro asymptomatique	SLA/PDC	HPLC	(127)
Liquide cérébro-spinal	BMAA	Présence de BMAA au sein du CNS ; mais absence de relation entre la présence de BMAA et l'ALS	12 SLA	UHPLC-MS/MS	(128)
Cerveau	BMAA	Pas de BMAA libre ou liée	20 MA	UPLC-MS/MS-DC	(129)
Cheveux	BMAA	Corrélation entre la présence de BMAA dans les cheveux étudié et la consommation de coquillages	Aucune	UHPLC-MS/MS	(130)

Table 4 : Détection de la BMAA au sein d'échantillons humains. BMAA : 6-N-méthyl-amino-L-alanine ; DAB : acide 2,4-diaminobutanoïque ; SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique ; MA : maladie d'Alzheimer ; MH: Maladie de Huntington; MP : maladie de Parkinson ; HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression ; UPLC : Chromatographie Liquide Ultra Performance.

Lien entre la BMAA et les maladies neurodégénératives

La SLA est aussi appelée maladie de Charcot ou maladie de Lou Gehrig. Selon Orphanet, l'incidence (environ 1/50 000 par an) et la prévalence (environ 1/20 000) sont relativement uniformes dans les pays occidentaux. Il existe une légère prédominance masculine (ratio H/F d'environ 1,5/1). L'âge moyen de début de la SLA sporadique est d'environ 60 ans. Si la majorité des cas est d'origine sporadique (probablement environnementale), 5 à 10% sont familiaux (génétiques). Parmi les gènes impliqués dans la survenue de la maladie, il y a le gène TARDBP (code pour la protéine TAR DNA-binding protein 43, TDP-43) ainsi que C9orf72. Ce dernier serait muté dans environ 40 % des cas familiaux (Figure 9A).

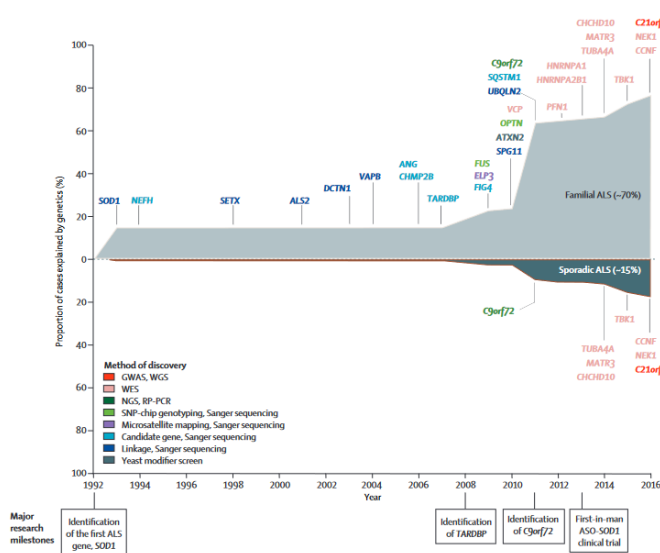
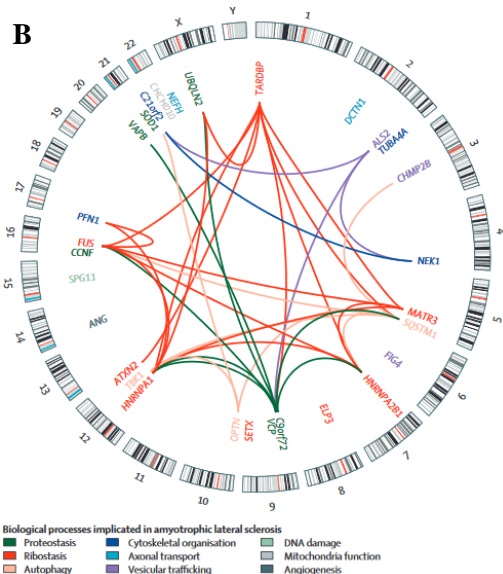
A**B**

Figure 9 : Paysage génétique de la SLA entre 1993 et 2016 et les processus biologiques impliqués. (A) Les cas familiaux de SLA représentent environ 10 % de tous les cas de SLA. De ces 10%, environ 70% peuvent être expliqués génétiquement. GWAS = étude d'association à l'échelle du génome. WGS = séquençage du génome entier. WES = séquençage de l'exome entier. NGS = séquençage de nouvelle génération. RP-PCR = réaction en chaîne par polymérase amorcée par répétition. SNP = polymorphisme mono nucléotidique. ASO = oligonucléotide anti sens. **(B)** Interactions entre gènes associés à la SLA et leur implication au sein des fonctions cellulaires. Le cercle extérieur est un idéogramme de caryotype montrant 24 chromosomes autosomiques, chromosome X, et chromosome Y; le cercle intérieur montre l'emplacement de chaque gène. Les liens entre les gènes représentent des interactions au niveau des protéines ou des gènes. Les données d'interaction ont été obtenues auprès du Biological General Repository for Interaction Datasets (131).

La SLA est ainsi une maladie multifactorielle c'est-à-dire soumise à l'influence de la génétique et probablement de l'environnement. Concernant les facteurs environnementaux, plusieurs facteurs sont suspectés de participer à l'apparition de la maladie ou d'accélérer sa progression. Parmi eux, on trouve le tabac (132), l'exposition à des pesticides (133), la consommation de champignons (134) ainsi que l'exposition à la cyanotoxine BMAA.

o Cas de l'île de Guam

La SLA/PDC est une SLA atypique. C'est une MND qui semble avoir une origine environnementale. L'exposition aux génotoxines/neurotoxines présentes dans les graines de cycas (*Cycas sp.*) est particulièrement mise en cause. Ces graines étaient traditionnellement utilisées comme source de nourriture (Île de Guam, Etats-Unis) et/ou comme médicament (Guam, Kii-Japon, Papouasie-Indonésie). Malheureusement, les composés de graines contiennent des composés toxiques tels que la cycasine, qui produit le méthylazoxyméthanol (MAM), et la BMAA. Ces toxines sont en mesure de reproduire les symptômes caractéristiques de la neuropathologie SLA/PDC (Table 3).

Ce sont les travaux de Cox et collaborateurs qui ont conforté l'hypothèse de la BMAA en tant que facteurs favorisant l'apparition de la SLA. En effet, ils identifient la bioaccumulation de la BMAA au sein

des différents niveaux trophiques de l'écosystème au sein de l'île de Guam (135). La nature chimique de la BMAA n'indique pas, en première intention, une tendance à se bioaccumuler au sein de l'écosystème. Contrairement à d'autres composés bioamplifiés, la BMAA n'est pas un composé lipophile. De ce fait, la toxine n'apparaît pas comme sujette à s'accumuler dans les tissus adipeux. Un autre mécanisme pourrait être responsable de la bioamplification de la BMAA. Les acides aminés sont des composants des protéines ; étant structurellement analogue d'acide aminé, la BMAA pourrait s'incorporer au sein des protéines (Figure 10). En effet, l'équipe de Murch a constaté que la BMAA est certes présente sous forme libre mais également sous forme « liée » (62). Il existe alors un réservoir neurotoxique endogène de BMAA « liée », associée aux protéines. Le catabolisme protéique libère de façon lente et progressive de grandes quantités de BMAA, dans toutes les matrices testées (d'un facteur 10 à 240, Figure 10). Ces observations, en plus de la détection de BMAA dans le cerveau de Chamorros décédés de la SLA-PDC (62) appuient l'implication de la BMAA dans l'étiologie de la maladie. L'incorporation de la toxine au sein des protéines pourrait expliquer la longue phase de latence observée avant le développement des premiers symptômes de la maladie, mais aussi la bioaccumulation dans les organismes.

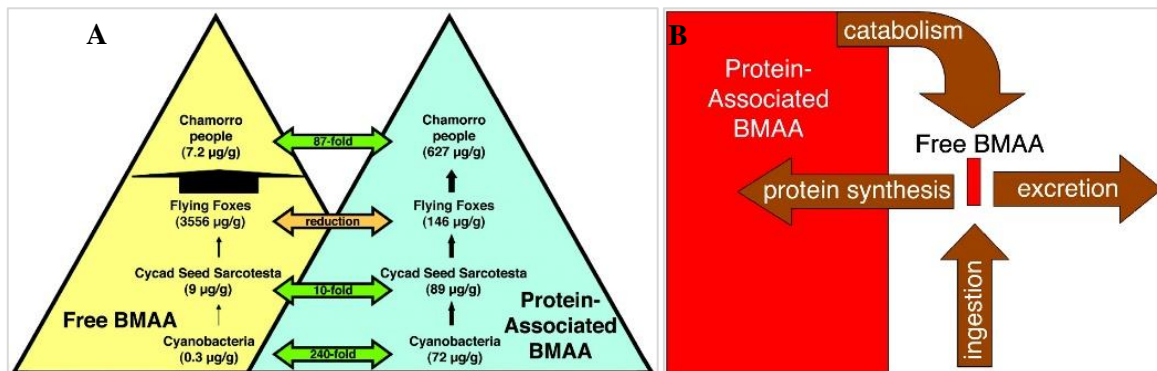


Figure 10 : Conséquence de la présence de la BMAA sous deux formes (formes libres et formes liées). (A) Biomagnification de la forme libre et de la forme liée de la BMAA au sein de l'écosystème de Guam. (B) Schématisation du réservoir endogène neurotoxique (62).

d) Mécanismes putatifs de la BMAA

Nous venons de voir que la BMAA est un acide aminé non canonique, produit par divers taxons de phytoplancton, y compris des souches de cyanobactéries d'eau douce, de diatomées marines et de dinoflagellés. Cette toxine serait impliquée dans les maladies neurodégénératives à développement lent, notamment l'ALS/PDC. Néanmoins, le lien épidémiologique entre l'exposition humaine à la toxine et le développement de telles pathologies demeure à être précisément identifié. De récentes études, *in vitro* et *in vivo*, positionnent la BMAA comme une toxine développementale, qui ciblerait des zones spécifiques du système nerveux central (102,121,123). Différentes hypothèses de mécanismes

d'actions de la BMAA sur le SNC ont été proposées, sans qu'elles soient nécessairement indépendantes les unes des autres.

- La BMAA induit une excitotoxicité via les récepteurs au glutamate

Une stimulation excessive des neurones postsynaptiques peut être excitotoxique et conduire à la mort neuronale. Ce phénomène a été très largement observé en présence de BMAA (Table 2, Table 3).

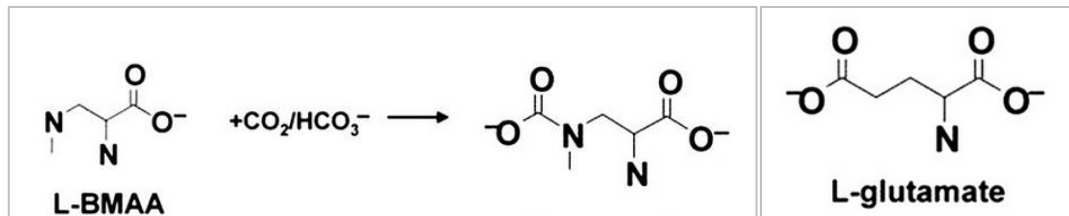


Figure 11 : L'ion carbamate de BMAA peut simuler un agoniste du glutamate. (A) L'interaction BMAA/ HCO_3^- est susceptible de former une molécule structurellement apparentée au glutamate. (B) structure chimique du glutamate (136).

Les effets de la BMAA ont d'abord été étudiés à des concentrations relativement élevées (1 mM à 3 mM) sur des cultures primaires de neurones corticaux de souris (137). Les effets neurotoxiques observés semblent dépendre de la présence de l'ion bicarbonate. L'interaction de l'ion bicarbonate avec la toxine fournit un groupe carboxylique nécessaire à l'interaction avec les mGluR (137). Cette « relation » a été également identifiée dans d'autres études *in vitro*, incluant des cellules non neuronales telles que les cellules gliales (Table 2). Ainsi, l'interaction BMAA/ HCO_3^- est susceptible de former une molécule structurellement apparentée au glutamate, agissant comme un agoniste de ses récepteurs (Figure 11). Plusieurs études menées par Pierozan et collaborateurs (17,123) appuient l'implication des mécanismes glutamatergiques dans la toxicité de la BMAA. En effet, l'antagoniste des récepteurs NMDA (MK-801) et l'antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate (MCPG) protégeraient contre les altérations induites par la BMAA (17). L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques non NMDA (CNQX) a empêché la diminution de la viabilité cellulaire induite par la BMAA dans des cultures mixtes contenant à la fois des cellules neuronales et gliales. Dans des cultures composées uniquement de neurones, cet effet « protecteur » n'a pas été observé. D'une part cela suggère l'importance des interactions des populations cellulaires neuronales et gliales, d'autre part cela souligne l'implication des récepteurs AMPA gliaux dans la toxicité induite par la BMAA.

La cascade d'événements cellulaires et moléculaires conduisant à la SLA n'est pas caractérisée à l'heure actuelle. Une des hypothèses avancées est que l'excitotoxicité induite par le glutamate serait au cœur des dysfonctionnements cellulaires, conduisant à la neurodégénérescence.

- Les acteurs cellulaires impliqués dans la neurodégénérescence induite par la BMAA

Certains processus neurodégénératifs impliquent des marqueurs biologiques récurrents, notamment la TDP-43 et la protéine Tau. Dans des conditions neurodégénératives telles que la MA, la dynamique et l'équilibre de la liaison tau-microtubule sont gravement affectés en raison de ses modifications post-traductionnelles aberrantes, notamment l'acétylation et l'hyperphosphorylation de la protéine. Ces événements se traduisent par des changements conformationnels qui ont pour conséquence de former des enchevêtrements neurofibrillaires (NFT) qui s'agrègent dans le cytosol (Figure 12). La formation des plaques séniles formées par des dépôts de protéines bêta-amyloïdes est une caractéristique pathologique de la MA.

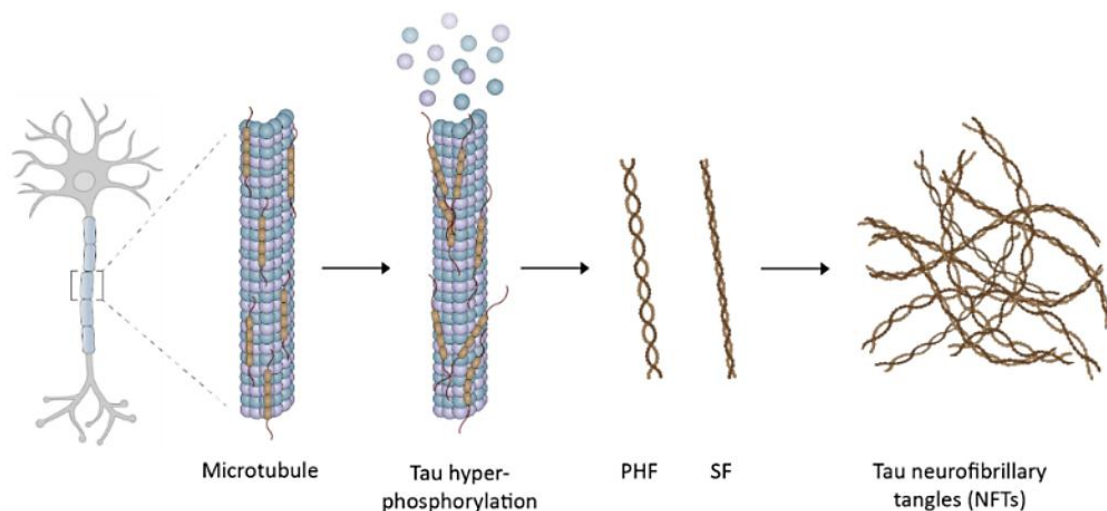


Figure 12 : Le développement des enchevêtrements neurofibrillaires tau (NFT). Les protéines tau s'auto-agrègent pour former des PHF (Paired Helical Filament) et des filaments droits SF (Straight filaments), ce qui conduit ensuite à la formation de NFT (138).

La protéine est associée aux microtubules et favorise l'assemblage et la stabilité des microtubules qui est liée au flux axoplasmique et aux activités neuronales critiques dans les conditions physiologiques. Diverses études ont montré que la BMAA interfère avec le niveau de phosphorylation de la protéine Tau. D'une part, elle inhiberait l'activité de sa principale phosphatase PP2A 5 (protéine phosphatase 2A), d'autre part, elle augmenterait l'activité de la GSK-3 β kinase (99,126). Comme évoqué précédemment, la BMAA agit également comme un agoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate tels que mGluR5 (17,139). Cette activation dans des cultures primaires de neurones corticaux entraîne une forte diminution de l'activité de PP2A. Cette diminution de l'activité de la phosphatase PP2A a entraîné un niveau plus élevé d'hyperphosphorylation de Tau. Une étude épidémiologique rapporte une activité catalytique de PP2A significativement réduite dans les cerveaux de la cohorte de Guam atteinte du syndrome ALS/PDC (126). De plus, la BMAA entraîne une augmentation de la synthèse de GSK-3 β et de l'activité kinase, dont l'une des cibles est la protéine Tau (140,141). Les effets

toxiques de la BMAA sont annulés par l'inhibition de l'activité GSK-3 (142). Ces résultats ont été reproduits avec des inhibiteurs chimiques de la GSK-3 et des molécules naturelles telles que le phosphate de sphingosine-1 ou l'acide isoleucaronique (Figure 13).

La TDP-43 est une protéine codée par le gène TARDBP, et est présente dans le noyau cellulaire de la plupart des tissus. Elle se lie à l'ADN et participe à la régulation de la transcription. Elle peut également se lier à l'ARN pour assurer sa stabilité. En coupant et réarrangeant les ARNm par épissage alternatif, TDP-43 contrôle la production de différentes versions de certaines protéines (143). De nombreuses mutations du gène TARDBP ont été identifiées chez des patients atteints de SLA (144). La plupart de ces mutations affectent la région de la protéine impliquée dans la maturation de l'ARNm, ce qui perturbe la production d'autres protéines. Un mauvais repliement de TDP-43 conduit notamment à la formation d'agrégats de protéines de motoneurones chez certains patients SLA. Plusieurs études, *in vitro* et *in vivo* suggèrent que la BMAA entraîne la surexpression de TDP-43 et la formation d'agrégats de protéines (Table 2 et Table 3). Or, ces formes spécifiques de TDP-43 sont présentes chez les patients atteints de SLA ainsi que dans le cervelet et l'hippocampe des rats traités par perfusion intrathécale de BMAA ; ces formes sont également présentes dans la moelle épinière où une légère accumulation et agrégation de TDP-43 dans le cytosol de certains motoneurones lésés et dégénérés ont été observés (145).

Ces données viennent questionner sur la limite d'exposition à la BMAA. Plusieurs voies d'expositions sont à considérer. L'être humain est en effet susceptible d'être exposé à cette toxine par voie orale par le biais d'eau contaminée mais également via l'alimentation. La présence de neurotoxines au sein de compléments alimentaires à base de cyanobactéries est également préoccupant (47,70,146). Les populations animales et humaines peuvent également être exposés par voie aérienne, par aérosolisation. Les différentes études toxicologiques, notamment les travaux de Pierozan et collaborateurs, soulignent l'influence du stade de développement lors de l'exposition.

En résumé, la taille et la fréquence des efflorescences microalgales et cyanobactériennes augmentent parallèlement à la hausse des températures mondiales et à l'augmentation de l'eutrophisation, ce qui a des implications pour la santé humaine. En effet, les toxines, telles que la BMAA, ont été impliquées dans le déclenchement de maladies neurodégénératives telles que la SLA/PDC. La BMAA, qui est un analogue d'acide aminé non protéique soluble dans l'eau peut se bioaccumuler dans la chaîne trophique, sous une forme libre et liée aux protéines. L'un des mécanismes impliqués dans la bioaccumulation de BMAA est la mauvaise incorporation dans les protéines à la place de l'acide aminé canonique L-sérine. La BMAA serait un analogue des récepteurs glutamatergiques et ainsi interférer avec les systèmes glutamatergiques.

La prolifération d'espèces productrices de BMAA est favorisée par l'utilisation de certains pesticides. Le glyphosate et le glufosinate d'ammonium sont parmi les herbicides les plus utilisés. Comme la BMAA, ce sont des analogues structuraux d'acides aminés et peuvent avoir des effets néfastes sur le système nerveux central. Ces composés sont donc présents de façon concomitant dans l'environnement et peuvent avoir des cibles moléculaires communes.

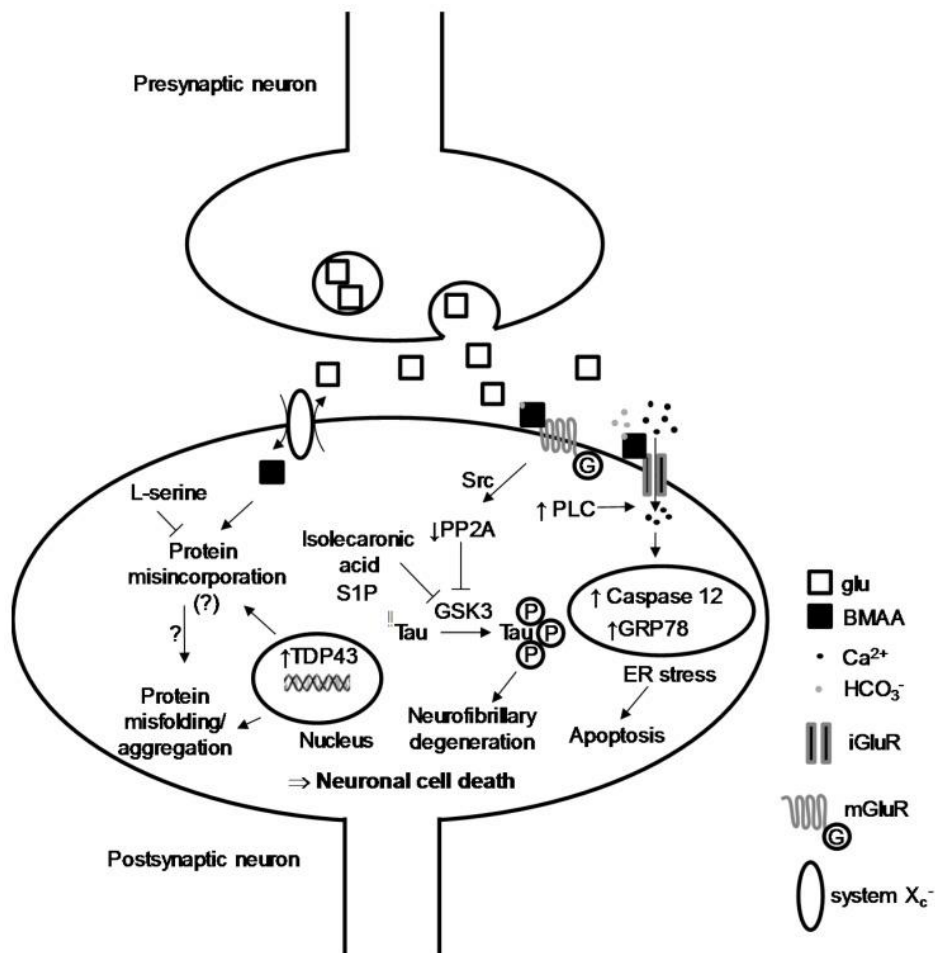


Figure 13 : Aspects moléculaires des mécanismes de neurodégénérescence potentiellement induits par la BMAA. Au niveau d'une synapse glutamatergique, la toxine BMAA se lie aux récepteurs ionotropes (i) et métabotropes (mGluR). Leur activation entraîne une augmentation significative du Ca²⁺ intracellulaire, directement via iGluR et indirectement via mGluR (signalisation PLC). Cette augmentation de [Ca²⁺]_i favorise le stress du RE et l'apoptose cellulaire. En parallèle, l'inhibition de PP2A induit une hyperphosphorylation de la protéine Tau, qui produit une dégénérescence de l'enchevêtrement. Enfin, le système X_c⁻ (cotransport cystine/glutamate) est détourné par la BMAA pour pénétrer le neurone postsynaptique. Une fois dans le cytoplasme, la toxine est susceptible de s'insérer dans les protéines cellulaires néosynthétisées et de provoquer l'aggrégation des protéines mal repliées qui conduit à la mort neuronale. GRP78 : protéine de 78 kDa régulée par le glucose ; GSK-3 : glycogène synthase kinase-3 ; iGluR : récepteurs ionotropes glu ; mGluR : récepteurs métabotropiques glu ; PLC : phospholipase C ; PP2A : protéine phosphatase 2A ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; Src : proto-oncogène tyrosine-protéine kinase ; TDP-43 : protéine de liaison à l'ADN TAR 43 (18).

II) Les pesticides

1. Définition et classification

Le terme « pesticides » provient de l'anglais. Le terme *pest* se rapporte à ce qui est nuisible (espèce animale ou végétale) et le suffixe *-cide* signifie « tuer ». Un pesticide désigne donc une substance utilisée pour lutter contre des organismes estimés nuisibles. Ce terme regroupe notamment les fongicides, les insecticides et les herbicides (Figure 14). Dans une définition plus large, celle de la réglementation européenne, les pesticides sont des produits « fabriqués ou naturels, ne contenant pas d'organisme vivant ». Cette définition regroupe ainsi les produits dits « phytopharmaceutiques », les biocides, ainsi que des médicaments à destination humaine et vétérinaires.

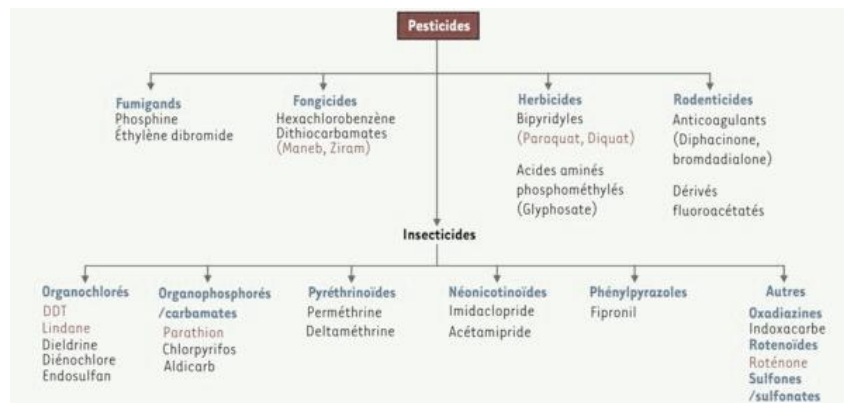


Figure 14: Les différentes familles de pesticides. En rouge, quelques molécules pour lesquelles l'effet neurotoxique chez les mammifères a été mis en évidence (147).

L'agriculture dite conventionnelle repose actuellement sur l'utilisation généralisée de pesticides pour lutter contre divers « ravageurs » (espèces adventices, champignons, insectes) et ainsi assurer le rendement des cultures et nourrir une population en croissance constante. L'utilisation généralisée des pesticides dans l'agriculture conduit à la contamination des sols et peut intégrer ainsi la chaîne trophique. La persistance des résidus de pesticides dans le sol est une menace majeure en premier lieu pour les organismes vivants du sol, qui soutiennent un nombre important de services écosystémiques. Bien que les autorités n'autorisent les pesticides sur le marché qu'après certaines évaluations toxicologiques, celles-ci s'avèrent parfois incomplètes. En effet, certains paramètres sont rarement abordés tels que les effets chroniques, les effets à moyen-long terme et l'utilisation de faibles doses/concentrations.

2. Pesticides et maladies neurodégénératives

Les effets toxiques potentiels des pesticides sur les organismes non ciblés, y compris les humains, suscitent de vives inquiétudes. Dans de nombreux cas, la cible moléculaire d'un pesticide est partagée par des espèces non ciblées. Le nombre de recherches étudiant la neurotoxicité des pesticides est ainsi croissante, mais demeure réduite pour certaines substances actives. Des études épidémiologiques ont suggéré un lien entre la survenue des maladies neurodégénératives et le fait de travailler ou de vivre au

voisinage d'une exploitation agricole utilisant des pesticides. Les cas d'empoisonnement aigu, notamment recensé par les centres anti-poisons, avec ces molécules démontrent leur caractère neurotoxique. La mise en évidence de la présence de pesticides, à forte dose, dans des structures cérébrales de patients atteints de parkinson suggère de réelles conséquences à une exposition chronique à ces pesticides (148).

Depuis le 4 mai 2012, un décret reconnaît officiellement la MP comme maladie professionnelle et établit un lien de causalité entre cette pathologie – seconde maladie neurodégénérative en France après la MA – et l'usage des pesticides. Chez la souris, l'exposition au paraquat permet de modéliser la maladie de Parkinson. Ce composé augmente l'expression et l'aggrégation de l' α -synucléine formant des corps de Lewy, caractéristique de la MP (149). Le rapport INSERM de 2021 « Pesticides et effets sur la santé, nouvelles données » indique tous les herbicides sans distinction pourraient avoir un rôle dans l'apparition de la MP chez les personnes exposées à ces substances dans le cadre professionnel.

Si certains pesticides sont interdits dans notre pays, leur interdiction n'est pas valable hors des frontières. Malgré leur interdiction en France les effets du DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophényl) éthane) et de la chlordécone demeurent à être considérés compte tenu de leur persistance et de leur rémanence dans les sols, jusqu'à plusieurs décennies après leur utilisation. Bien qu'interdites dans la plupart des pays, certaines de ces molécules, comme le DDT, demeurent utilisées pour le contrôle du vecteur de la malaria dans les zones endémiques. La France est le troisième consommateur mondial, derrière les Etats-Unis d'Amérique et le Japon. En tant que premier pays producteur agricole européen, la France est aussi le premier utilisateur de pesticides en Europe. L'agriculture est la première consommatrice de pesticides en France, ce qui représente 92 % des utilisations totales.

3. Utilisation des pesticides en France

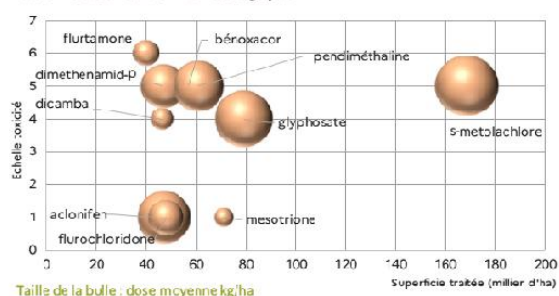
Selon le ministère de l'Agriculture, le recours au désherbage chimique reste la principale modalité d'élimination des adventices en grandes cultures. Parmi les herbicides autorisés les plus utilisés en France, on retrouve notamment le S-métolachlore ainsi que le glyphosate (Figure 15). Le glyphosate est classé en mars 2015 comme « probablement cancérogène » par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC). Le CIRC est une agence de l'OMS qui précise que ce classement est une évaluation du niveau de preuves du danger engendré par l'exposition aux produits à base de glyphosate ; En 2017, l'Autorité européenne des produits chimiques, l'ECHA, a réaffirmé que le glyphosate n'avait pas de caractère cancérogène, mutagène ou reprotoxique (CMR). En 2021, néanmoins, l'INSERM estime dans son rapport public "*Pesticides et santé*" que le lien entre l'exposition au glyphosate et la survenue de certaines pathologies serait très sous-estimé. De plus, il existe une certaine omnubilation des

scientifiques à étudier cette substance uniquement d'un point de vue « cancer » qui a pour conséquence d'occulter les autres aspects de sa toxicité.

A. Plantes sarclées : principales substances actives utilisées avant semis ou au semis

Substances actives	% surfaces ayant reçu la SA			Quantité totale de SA appliquée (tonne)		
	2011	2014	2017	2011	2014	2017
S-metolachlore	45	56	56	211	235	212
Glyphosate	24	23	26	86	50	84
Mesotrione	16	20	24	7	8	8
Pendimethalin	17	17	20	58	51	52

B. Principales substances herbicides sur plantes sarclées en 2017 selon classification toxicologique



C. Principales substances herbicides sur plantes sarclées en 2017

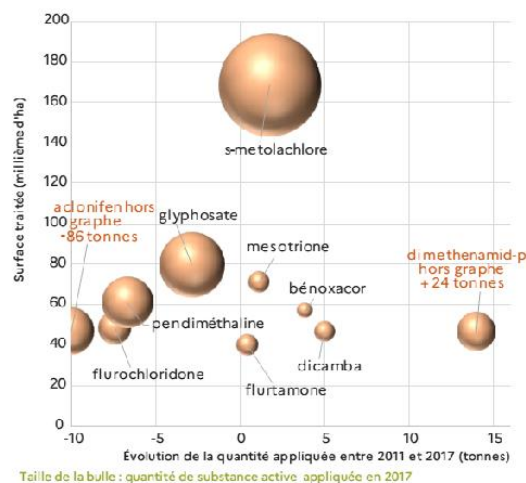


Figure 15 : Principales substances actives des herbicides utilisées sur plantes sarclées et leur classification toxicologique. (A) Principales substances actives utilisées avant ou après semis entre 2011 et 2017. (B) Principales substances herbicides classées selon leur classification toxicologique ; A noter que trois de ces substances sont classées CMR, à savoir le mesotrione, l'aclofen et le flurochloridone ; malgré de vifs débats, le glyphosate n'est pas classé CMR (C) Évolution de la quantité de substances actives appliquée entre 2011 et 2017. La taille de la bulle correspond à la quantité de substance active appliquée en 2017.

Actuellement, le glyphosate demeure autorisé en France. En 2017, son autorisation a été prolongée de 5 ans suite à un vote des pays européens. De façon concomitante, l'herbicide Basta F1, dont la substance active est le glufosinate d'ammonium, a été interdit par l'ANSES. L'agence a en effet conclu que son utilisation présente "des risques pour la santé des utilisateurs et des travailleurs, et des personnes présentes à proximité des espaces traités". Ailleurs en Europe, et dans le monde, le glufosinate se positionne comme un herbicide clé pour lutter contre les espèces végétales non souhaitées, résistantes au glyphosate. Le glufosinate d'ammonium est un herbicide à large spectre. L'utilisation du glufosinate a augmenté de façon exponentielle au cours de la dernière décennie (150).

4. Le glyphosate et le glufosinate d'ammonium

A) Structures chimiques et formules commerciales

Le glyphosate et le glufosinate d'ammonium (figure 16A et 16B) sont les substances actives d'herbicides commerciaux. Le glyphosate est commercialisé sous la formulation du Round Up (Monsanto / Bayer), Attila (Philea), Barbarian (Barclay Chemicals), ou encore Radikal (Fitogal). L'herbicide Basta F1 (Bayer)

est le seul produit qui fut autorisé en France dont la substance active fut le glufosinate d'ammonium. Son interdiction en France par l'ANSES date du 24 octobre 2017.

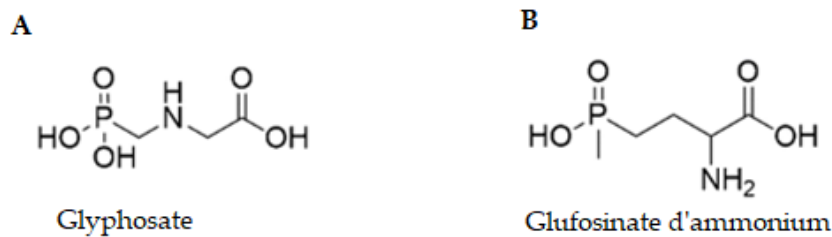


Figure 16 : Structure chimique des deux herbicides étudiés. (A) Le glyphosate. (B) Le glufosinate d'ammonium.

a) Mécanismes d'actions (cibles)

Le glyphosate et le glufosinate d'ammonium sont des organophosphorés. Ils sont, entre autres, établis pour agir par inhibition irréversible de l'acétylcholinestérase (AChE). Le rôle de cette enzyme est de cliver l'acétylcholine (neurotransmetteur) en choline inactive et en ion acétate. Cette réaction chimique permet aux neurones cholinergiques de revenir à l'état de repos après leur activation par des influx nerveux. Le glyphosate agit en bloquant la chaîne de synthèse des précurseurs d'acides aminés essentiels pour le fonctionnement de la plante, notamment pour la photosynthèse. Le glufosinate d'ammonium est un inhibiteur spécifique de la glutamine synthétase, enzyme nécessaire à la production de glutamine et à la détoxification de l'ammoniac. L'application de glufosinate sur les plantes entraîne une réduction de la glutamine et une augmentation des niveaux d'ammoniac dans les tissus, ce qui interrompt la photosynthèse et entraîne la mort de la plante (151).

B) Etude toxicologique de xénobiotique

Suite à l'exposition à un xénobiotique, le devenir de celui-ci dans l'organisme est divisé en quatre phases : l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion/Élimination (ADME). L'absorption décrit la pénétration du xénobiotique dans l'organisme ; la distribution s'attache à étudier la répartition du xénobiotique dans l'organisme, le métabolisme détermine l'éventuelle biotransformation (métabolisation) du xénobiotique et l'excrétion décrit l'élimination de l'organisme du toxique et de ses métabolites. La toxicocinétique dépend de plusieurs facteurs, tels que la concentration du xénobiotique, la durée de l'exposition, son poids moléculaire, son éventuelle lipophilie, la biodisponibilité et également la demi-vie de la substance et de ses métabolites. A l'échelle de l'organisme, il existe des barrières internes protégeant l'organisme des xénobiotiques. Elles sont au nombre de quatre : la barrière hémato-encéphalique (BHE) présente entre le sang et le parenchyme cérébral, la barrière hémato-liquidienne entre le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR), la barrière hémato-testiculaire entre le sang et les testicules, et la barrière placentaire entre la mère et le fœtus. Au niveau cellulaire,

la toxicocinétique est décrite en quatre phases (Figure 17). La première phase est l'entrée de la substance dans la cellule, par des mécanismes de diffusion facilitée ou active via des transporteurs appartenant à la famille des "solute carrier" (SLC).

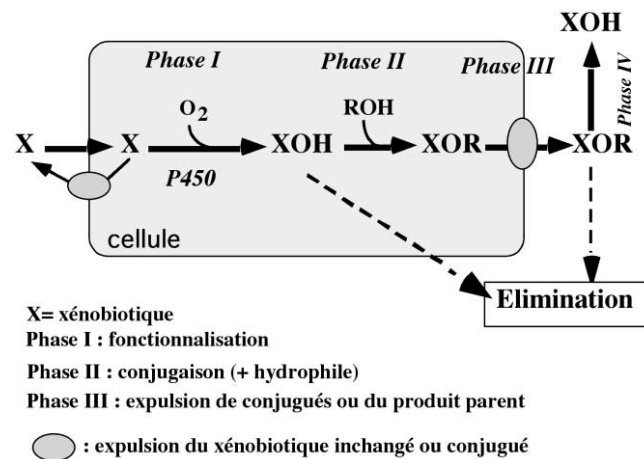


Figure 17 : Métabolisme général des xénobiotiques (152).

Lorsque le xénobiotique pénètre à l'intérieur de la cellule, il est converti par des enzymes du métabolisme de phase I (les cytochromes P450) et de la phase II (glutathion-S-transférase, ou GST ; N-acétyltransférase, ou NAT). La substance étrangère sort de la cellule lors de la phase III, par des transporteurs ATP-dépendants de la superfamille des "ATP-binding cassette" (ABC). En fonction de leur polarité, les métabolites ainsi produits peuvent être excrétés de l'organisme dans les urines, ou encore via la bile. Les métabolites générés par le système de détoxification de l'organisme peuvent s'avérer plus toxiques que la molécule mère ; en toxicologie, l'exemple bien connu est celui du benzène (153). En effet, le benzène est métabolisé essentiellement dans le foie, mais aussi dans les autres tissus où il s'est fixé, notamment la moelle osseuse. La première réaction, catalysée par le système du cytochrome P450 (CYP2E1), conduit à la formation d'époxybenzène. L'absence d'effets néfastes chez les souris knockout CYP2E1 (souris dépourvue de l'activité enzymatique CYP2E1) montre que cette étape de métabolisation est essentielle dans la toxicité du benzène (154). Malgré les capacités cellulaires de détoxification, les substances xénobiotiques telles que les herbicides peuvent activer de nombreuses voies de signalisation et entraîner des effets délétères chez des organismes non-cibles.

La plupart des herbicides peuvent induire un stress oxydant via la production importante des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ce stress implique notamment des enzymes et des molécules chargées de limiter le stress oxydatif telles que le glutathion oxydé (GSH), la GST, Glutathion Peroxydase (GPX) ou encore la vitamine C (155). Si le glyphosate et le glufosinate induisent du stress oxydatif (156), leurs mécanismes de toxicité sont aujourd'hui décrits, au moins partiellement, dans la littérature.

C) Le Glyphosate

a) Cible principale

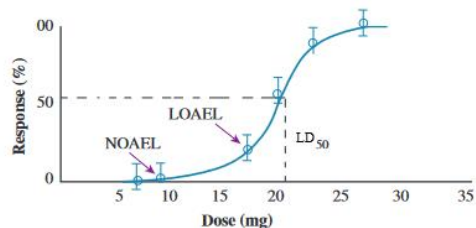
Le glyphosate (*N*-(phosphonométhyl)glycine) est un herbicide systémique à large spectre. La fonction herbicide du glyphosate a été découverte en 1970 par John Franz, un chimiste de la société Monsanto, qui a produit plusieurs années plus tard le premier herbicide à base de glyphosate (GBH, *Glyphosate based herbicide*), le Roundup® (157). De nos jours, il existe des centaines de GBH commercialisés sous différentes marques dans plus de 100 pays à travers le monde ; il s'agit de la substance active la plus utilisée dans le monde (158). Les GBH contiennent, en plus de la molécule active, des tensioactifs polaires, tels que le polyoxyéthylèneamide (POEA), l'acide sulfurique et l'acide phosphorique (159). Ceux-ci renforceront l'action herbicide du glyphosate en augmentant sa solubilité dans l'eau ainsi qu'en favorisant sa pénétration et son absorption dans la plante (160). D'un point de vue toxicologique il faut donc différencier l'action de la substance active, le glyphosate, des surfactants.

b) Valeurs toxicologiques

Dans le cadre d'études toxicologiques, il existe plusieurs paramètres standard pour apprécier la toxicité d'un composé. La dose létale médiane, DL50, correspond à la dose à laquelle 50% des organismes ayant reçu la dose ne survivent pas. Dans la même logique, on étudie la CL50 (concentration létale médiane). Ce paramètre s'étudie en toxicité aiguë. En toxicité chronique, on peut apprécier la NOAEL/NOAEC, qui est la dose/concentration la plus élevée d'une substance qui, dans des conditions d'exposition définies, ne provoque aucun effet nocif observable/déTECTABLE (altération) sur la morphologie, la capacité fonctionnelle, la croissance, le développement ou la durée de vie des animaux testés.

La LOAEL/LOAEC est la dose/concentration la plus élevée d'une substance dans des conditions d'exposition définies, où un effet est observable/déTECTABLE (altération) sur l'un des paramètres ci-dessus. Ces paramètres sont illustrés au sein de la figure 18A. Plus ces paramètres possèdent une dose ou concentration faible, plus une substance va être considérée comme toxique (Figure 18B).

A.



B.

LD ₅₀	Classification
<5 mg/kg	Extremely toxic
5-50 mg/kg	Highly toxic
50-500 mg/kg	Moderately toxic
500-5,000 mg/kg	Slightly toxic
5000-15,000 mg/kg	Practically non-toxic
>15,000 mg/kg	Relatively harmless

Figure 18 : Illustration des paramètres toxicologiques et leur toxicité associée. (A) Représentation graphique de la NOAEL, LOAEL et LD50 (modifié d'après Gupta, 2018). (B) Classification de la toxicité d'une substance selon la DL50 (161).

En raison de préoccupations croissantes concernant la toxicité du glyphosate, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a réalisé en 2015 un examen des risques associés à l'utilisation du glyphosate, et les paramètres toxicologiques suivants ont été définis ou examinés sur la base d'études en laboratoire sur des lapins (EFSA, 2016). La NOAEL est de 100mg/kg de poids corporel par jour. La DJA (*Dose journalière acceptée*) est de 0,5mg/kg de pc par jour.

Plusieurs institutions ont déterminé la DL50 via les voies orale et cutanée. Au niveau européen, l'EFSA a défini, en 2015, une DL50 supérieure à 2000mg/kg de poids corporel pour les voies orale et cutanée (28). Au niveau mondial, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS), dans un avis conjoint, ont défini, en 2016, une DL50 de 5600 mg/kg de poids corporel pour la voie orale et supérieure à 2000 mg/kg du poids corporel pour la voie cutanée (FAO/WHO ; **Pesticide Residues in Food 2016**). En regard de l'échelle de toxicité (Figure 18) cela classerait le glyphosate en tant que molécule peu toxique.

c) Etudes épidémiologiques et expérimentales

Des cas de toxicité aiguë chez l'homme, après l'ingestion accidentelle ou intentionnelle de GBH, les rapports font état d'une perte de poids, des troubles gastro-intestinaux, pulmonaires, rénaux et hépatiques ainsi que l'apparition de maladies neurodégénératives quelques mois après l'ingestion (162–165).

- Effets génotoxiques

Le glyphosate possède également des effets génotoxiques. En 2017, une étude *in vitro* a montré que le glyphosate pouvait induire des dommages à l'ADN dans les leucocytes humains. Également, le glyphosate induit des changements épigénétiques (méthylation) dans les cellules animales (166). D'autres études font état d'une activité génotoxique associée à l'exposition aux GBH, mais celle-ci serait principalement liée au POEA, un surfactant présent dans les GBH (167).

- Effets néphrotoxiques

En 2019, une étude chez le rat a montré que l'exposition chronique aux GBH est néphrotoxique, entraînant la perte de cellules tubulaires par apoptose. De façon intéressante, la toxicité induite par le glyphosate dépendrait des récepteurs NMDA, qui sont des récepteurs ionotropiques au glutamate, qui seraient activés par le glyphosate (168).

- [Effets tératogènes ?](#)

Plusieurs études épidémiologiques menées dans plusieurs pays d'Amérique du Sud ont rapporté un nombre croissant de malformations chez les fœtus dans les zones de forte application de GBH, questionnant ainsi le potentiel tératogène de cet herbicide (169). Cependant, en 2016, la FAO a conclu dans son rapport sur les pesticides que le glyphosate n'est pas tératogène. Cette conclusion est basée sur plusieurs études menées sur des rats, dans lesquelles aucun effet délétère chez l'embryon n'a été répertorié avec des doses quotidiennes allant jusqu'à 3500mg de glyphosate par kilogramme de poids corporel (FAO/WHO, Pesticide Residues in Food 2016).

- [Effets sur le système nerveux](#)

- *Effets sur la neurogenèse*

Certains auteurs se sont penchés sur l'effet du glyphosate sur la neurogenèse. L'étude de Masood et collaborateurs (170) a démontré que les concentrations maximales admissibles de glyphosate reconnues par les autorités de protection de l'environnement réduisaient de manière significative la migration cellulaire et la différenciation des NSCs (*Neural stem cells*). De plus, l'expression du gène cytoprotecteur CYP1A1 a été régulée à la baisse tandis que l'expression du gène indicateur de stress oxydatif SOD1 a été régulée à la hausse. Leur résultat indique que le glyphosate est bel et bien une substance neurotoxique à considérer, en particulier pour le système nerveux en développement (170). Le glyphosate a été identifié comme génotoxique dès 70µM sur culture de cellules souches embryonnaires, basé sur l'observation de foyer de γH2Ax (Figure 19). Cette observation s'accompagnait d'une baisse du pouvoir prolifératif des cellules souches embryonnaires (Figure 19).

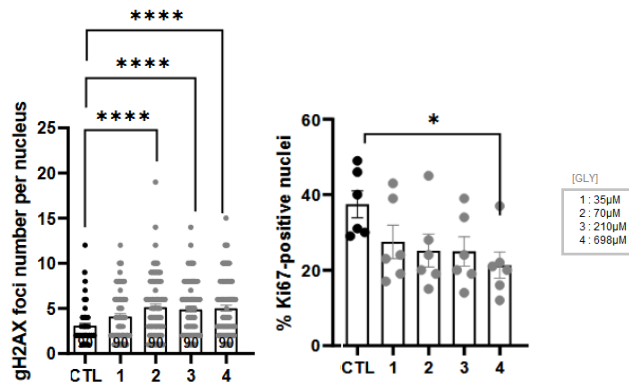


Figure 19: Effet du glyphosate (GLY) sur la génotoxicité (cassures doubles brins) et la prolifération cellulaire sur culture primaire embryonnaire de cellules souches. Le pouvoir prolifératif est visualisé grâce au marquage Ki67. La génotoxicité est déterminée via les foyers γ H2Ax témoignant de cassures doubles brins (Feat-Vetel et al., CEA, in preparation).

o Effets sur la transmission synaptique

Les neurotransmetteurs tels que le glutamate et la glycine sont libérés au niveau des synapses neuronales et sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire. Or, le glyphosate présente des similitudes structurales avec le glutamate et la glycine (Figure 20). Il pourrait donc interagir avec les acteurs de la neurotransmission et potentiellement la perturber. En effet, le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. La glycine est un neurotransmetteur inhibiteur majeur mais aussi un transmetteur qui aide à réguler l'activité au niveau du récepteur du glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (171). De façon intéressante, il existe un site de liaison spécifique pour la glycine sur le récepteur NMDA.

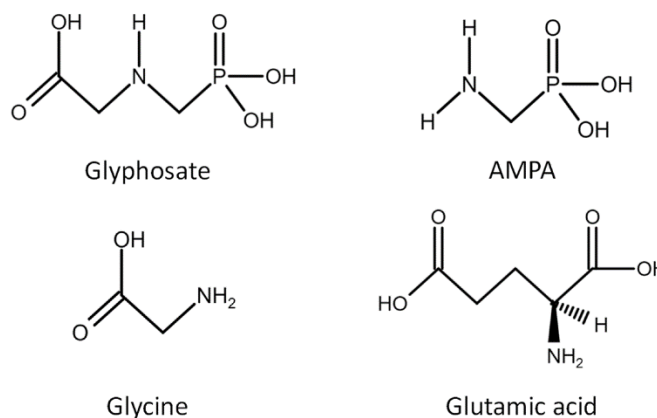


Figure 20: Structure chimique du glyphosate et de son métabolite majeur, l'AMPA, du glutamate et de la glycine (172)

Les GBH semblent interférer avec certains de ces processus de signalisation importants. Cattani et collaborateurs (173) démontrent qu'une exposition au RoundUp® (GBH) induit une augmentation de l'afflux de Ca^{2+} due à l'activation des récepteurs NMDA et des canaux calciques activés par la tension, ce qui provoque un stress oxydatif et la mort des cellules neuronales. Ils interprètent cela comme une

conséquence d'une libération excessive de glutamate déclenchant une excitotoxicité. Bien que l'entrée de calcium soit essentielle à l'apprentissage et à la mémoire, une entrée excessive de Ca^{2+} peut également entraîner la mort cellulaire.

Ultérieurement, Cattani et collaborateurs (174) ont mesuré les enzymes antioxydantes et rapportent des niveaux réduits de superoxyde dismutase (SOD), de glutathion -S-transférase ainsi que des niveaux appauvris en glutathion (GSH), tous indiquant une augmentation du stress oxydatif. Ils concluent que les GBH provoquent une excitotoxicité du glutamate, une mauvaise régulation de la transmission cholinergique, ainsi que des dommages oxydatifs. Également, ils rapportent une perturbation de la population astrocytaire qui fluctue entre PND15 (*Post-natal day*) et PND60 . Ils suggèrent que les mécanismes sont une interaction avec le récepteur NMDA et une diminution de l'activation de la signalisation p65 NF- κ B.

- *L'exposition au glyphosate, facteur étiologique de l'apparition de troubles du spectre autistique ?*

Il existe certaines preuves que l'exposition aux pesticides agricoles, en particulier les pesticides organophosphorés, peut augmenter le risque d'autisme (175). Pu et al. (176) ont examiné des souris juvéniles mâles exposées à de fortes concentrations de GBH via leur mère. Ils furent exposés du jour embryonnaire 5 (ED5) jusqu'au sevrage (PND21). Ils ont montré des anomalies comportementales typique du spectre autistique. Ultérieurement, avec du glyphosate pur, ils ont observé des effets comportementaux similaires chez la progéniture mâle (177). Ils concluent que c'était le glyphosate lui-même, et non les autres composants des GBH, qui provoque des effets de type autistique. D'autres études *in vivo* montrent une absence de neurotoxicité même à des concentrations élevées, de sorte que plusieurs institutions (dont l'EFSA et la FAO) ne considèrent pas, actuellement, le glyphosate comme une substance neurotoxique.

- *Implication dans la maladie de Parkinson*

Le glyphosate est mis en cause pour la survenue de maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Parkinson. Il existe une importante corrélation entre l'exposition aux herbicides et le risque de développer cette maladie (178). Depuis 2012, la maladie de Parkinson est reconnue en tant que maladie professionnelle. La maladie de Parkinson est le résultat de la mort de neurones dopaminergiques dans la substance noire (179). Les neurones dopaminergiques contiennent de la neuromélanine et contiennent également des concentrations plus élevées de fer et d'autres métaux que la plupart des neurones, ce qui les rend particulièrement vulnérables au stress oxydatif (180). Le

processus dégénératif implique également une inflammation, un dysfonctionnement mitochondrial ainsi qu'une excitotoxicité (181).

Il existe des preuves cellulaires et animales soutenant la vulnérabilité des neurones contenant de la dopamine au glyphosate. Les cellules PC-12 sont une lignée cellulaire contenant de la dopamine dérivée de cellules de phéochromocytome. Le glyphosate, à de faibles concentrations provoque une mort cellulaire dépendante de la dose et du temps de traitement de cette lignée (182).

D) Le glufosinate d'ammonium

Selon Takano et Dayan (151), au sein de la revue *Pest management science*, le glufosinate est une substance active clé pour lutter contre les espèces adventices, qualifiée de « mauvaises herbes », résistantes au glyphosate. L'utilisation combinée des deux substances fait même l'objet de recommandation. Les auteurs précisent que « *bien que la toxicologie du glufosinate ait suscité des inquiétudes, son utilisation correcte peut être considérée comme sûre* ». De ce fait, l'interdiction de l'utilisation de ce pesticide n'étant pas élargie à l'Europe, les deux substances actives sont souvent présentes de façon concomitante.

a) Cible principale

La phosphinothricine, ainsi que les dérivés de la méthionine sulfoximine, sont des analogues du glutamate qui présentent une activité herbicide sélective. Cet effet s'explique par des altérations du métabolisme de l'azote, résultant de l'inhibition de son enzyme clé chez les plantes, la glutamine synthétase (183). L'inhibition de l'enzyme provoque l'accumulation d'azote ammoniacal et inhibe la synthèse de la glutamine (Figure 21).

La dégradation de l'ammoniac au sein de notre organisme se réalise en effet par l'intermédiaire du cycle de l'urée et des glutamines synthétases (GS) présentes dans le foie (184). Dans le cerveau, l'élimination de ces ions dépend de la GS présente dans les cellules gliales astrocytaires (185). Considérant que le GLA pouvait inhiber la GS chez les plantes, une équipe a réalisé des mesures de l'ammoniac sérique chez des patients exposés au GLA (186). Chez chacun d'entre eux, une hyperammoniémie marquée a été détectée. Une hyperammoniémie peut avoir des conséquences cérébrales, impliquant notamment des phénomènes neuro-inflammatoires (187).

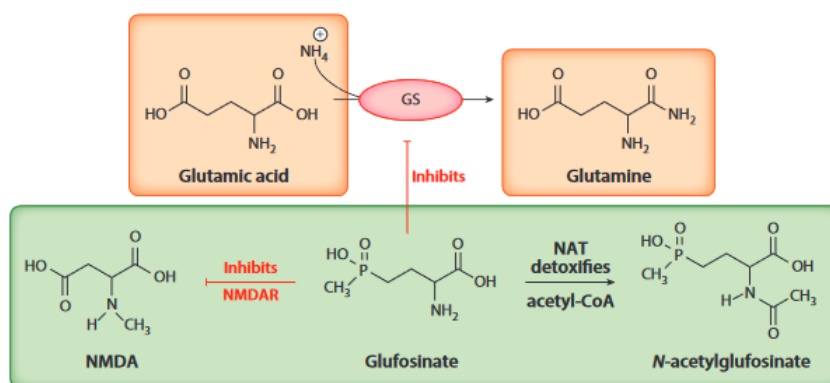


Figure 21 : Le GLA cible la glutamine synthétase. La toxicité du glufosinate est due à l'inhibition de la GS qui bloque la détoxification de l'ammoniac par des voies plus importantes chez les plantes que chez les mammifères, dans lesquelles le blocage du NMDAR peut être important (188)

b) Valeurs toxicologiques

Si l'on met en relation la Table 4 avec la Figure 18B, le glufosinate d'ammonium est classifiable comme toxique, sa toxicité variant selon le mode d'application. En effet, cette substance active ne serait pratiquement pas toxique via l'épiderme, mais hautement/modérément toxique si on considère d'autres voies d'administration. La DJA du GLA est basée sur la NOAEL la plus faible de 6,3 mg/kg de poids corporel/jour, obtenue par une étude chronique de toxicité développementale chez le lapin (Table 5). Classiquement, le facteur de sécurité pris est de 100. Pour le glufosinate d'ammonium celui-ci a été multiplié par trois. D'après l'EFSA Scientific Report, la DJA du GLA est de 6,3 mg/kg divisé par 300, soit 0,021 mg/kg de poids corporel/jour.

Espèces	Type d'étude	Paramètres	Valeurs	Effets
Souris	Aigüe – Orale	DL ₅₀	416 mg/kg de pc	
	Chronique	NOAEL	10.8 mg/kg de pc/j	carcinogène
Rat	Aigüe – Orale	DL ₅₀	1510mg/kg de pc	
	Aigüe – Derme	DL ₅₀	> 4000mg/kg de pc	
	Chronique	NOAEL	7.6mg/kg de pc/jour	carcinogène
	Chronique	NOAEL	10mg/kg de pc/jour	Anomalies du développement (avortements)
Lapin	Aigüe – Derme	DL ₅₀	> 2000mg/kg de pc (♂) < 2000mg/kg de pc (♀)	
	Chronique	NOAEL	6.3mg/kg de pc/jour	Anomalies du développement

Table 5 : Valeurs toxicologiques de référence concernant le glufosinate d'ammonium (189)

c) Etudes épidémiologiques

Le glufosinate d'ammonium est la substance active de l'herbicide commercialisé sous le nom BASTA[®] par la firme Bayer. Sa formulation contient également des agents tensioactifs, de l'éthylène glycol, des colorants et de l'eau. L'utilisation d'herbicide à base de glufosinate a augmenté, et de façon concomitante, les empoisonnements par ingestion accidentelle ou volontaire. L'empoisonnement par les herbicides contenant du GLA peut résulter à la fois de la matière active et du surfactant. Les

symptômes cliniques peuvent être classés en deux catégories. Les symptômes initiaux sont caractérisés par des symptômes gastro-intestinaux, qui peuvent être principalement associés à l'effet irritant des muqueuses du surfactant. Les symptômes qui se développent plus tard sont caractérisés par des troubles neurologiques au niveau de la mémoire, de l'attention et de l'anxiété (190,191) ; Les symptômes discutés précédemment proviennent d'une exposition directe à l'herbicide, volontaire ou accidentelle. Au sein d'une cohorte de femmes, celui-ci était détecté dans 18% des femmes non enceintes, alors que son absence de détection chez les femmes enceintes peut provenir de l'hémodilution causée par la grossesse. Un métabolite du glufosinate, le MPPA a été détecté dans la totalité des échantillons de sang maternel et du cordon ombilical. Dans les échantillons de femmes non enceinte, le métabolite a été retrouvé dans 67% des échantillons (192). García et al. (193) ont étudié les effets tératogènes potentiels du glufosinate et rapportent un risque de malformations congénitales. Cela a été également démontré chez la souris (194). Ces études soulignent l'importance de considérer les conséquences d'une exposition foetale au glufosinate d'ammonium, même lorsque les mères ont un phénotype sain. De plus, ces résultats illustrent les conséquences d'une exposition précoce aux polluants de l'environnement ; cette notion est appelée "*pregnancy exposome*".

d) Etudes expérimentales

- Effets comportementaux :

Chez un modèle murin, l'exposition des nouveau-nés *in utero* et en post-natal au glufosinate affecte le développement sensori-moteur ainsi que les capacités de communication (émission d'ultrasons) entre la mère et les individus de la portée. De plus, le poids relatif du cerveau est également affecté (Figure 22).

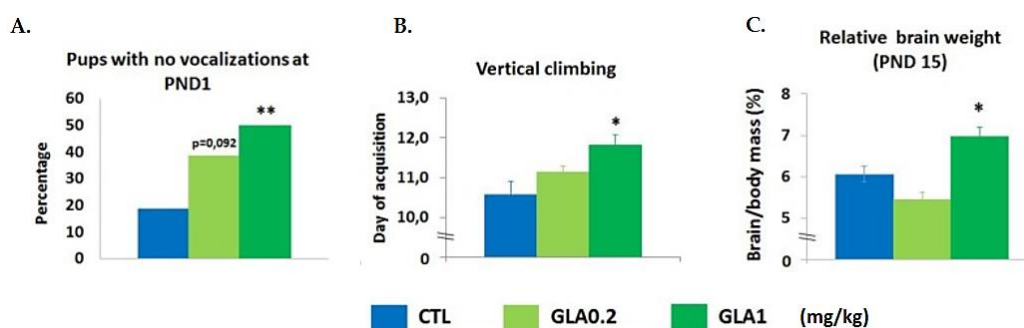


Figure 22 : L'exposition périnatale au glufosinate ammonium perturbe les paramètres neurodéveloppementaux. (A) Au jour postnatal 1, les souris exposées au GLA affichent des déficits de communication de façon dose/dépendante. (B) Evaluation de la capacité des souriceaux à escalader une barre verticale. (C) Au jour 15 après la naissance, le poids du cerveau, relatif au poids corporel est affecté (195)

Cette étude démontre une forte sensibilité au glufosinate lorsqu'il est administré pendant les périodes prénatales et postnatales. Les perturbations comportementales observées sont typiques de

manifestations des troubles du spectre autistique (TSA). De plus, le GLA (ou ses métabolites) agit sur la migration des précurseurs neuronaux, les neuroblastes, et affectant ainsi le réseau neuronal (196).

Ces travaux questionnent aussi la NOAEL déclarée du GLA. En effet, les effets ont été visibles à 3 mg/kg par semaine, soit l'équivalent de 0,4286 mg/kg/jour. Or, la NOAEL la plus faible pour le GLA a été fixée à 2,1 mg/kg/jour sur la base d'une étude d'alimentation chronique de 2 ans chez le rat. Une révision de la NOAEL apparaît comme étant de rigueur ; cela entraînerait *de facto* une révision de la DJA (196).

- Effets sur la neurogenèse

La perturbation de la migration des neurones immatures a été observée au sein d'une importante niche neurogénique, la zone sous-ventriculaire (SVZ) qui est une niche neurogénique. La migration des neuroblastes est perturbée. Sa capacité à former des chaînes a été rapportée (197). Ces données confortent la sensibilité des niches neurogéniques aux polluants environnementaux. La SVZ serait une « fenêtre du cerveau », du fait de sa structure unique, composée de capillaires fenestrés perméables et donc un manque de BHE endothéliale (198,199). Par conséquent, la niche des cellules souches de la SVZ est en première ligne suite à une exposition aux xénobiotiques systémiques, et est donc susceptible d'être extrêmement sensible aux toxiques environnementaux.

Bien qu'il soit maintenant bien connu que le GLA est neurotoxique et structurellement proche du glutamate, ses effets délétères potentiels sur la différenciation des cellules souches neurales *in vitro* sont restés inexplorés jusqu'en 2018. L'étude menée en parallèle par le CEA indique que le glufosinate d'ammonium n'affecte pas la prolifération cellulaire des cellules souches neurales embryonnaires à 2, 7 et 24 µM. Nos collègues du CEA ont montré que le glufosinate d'ammonium possède une activité génotoxique corrélée à une augmentation du nombre de caspases-3 clivées (CC3) (Figure 24).

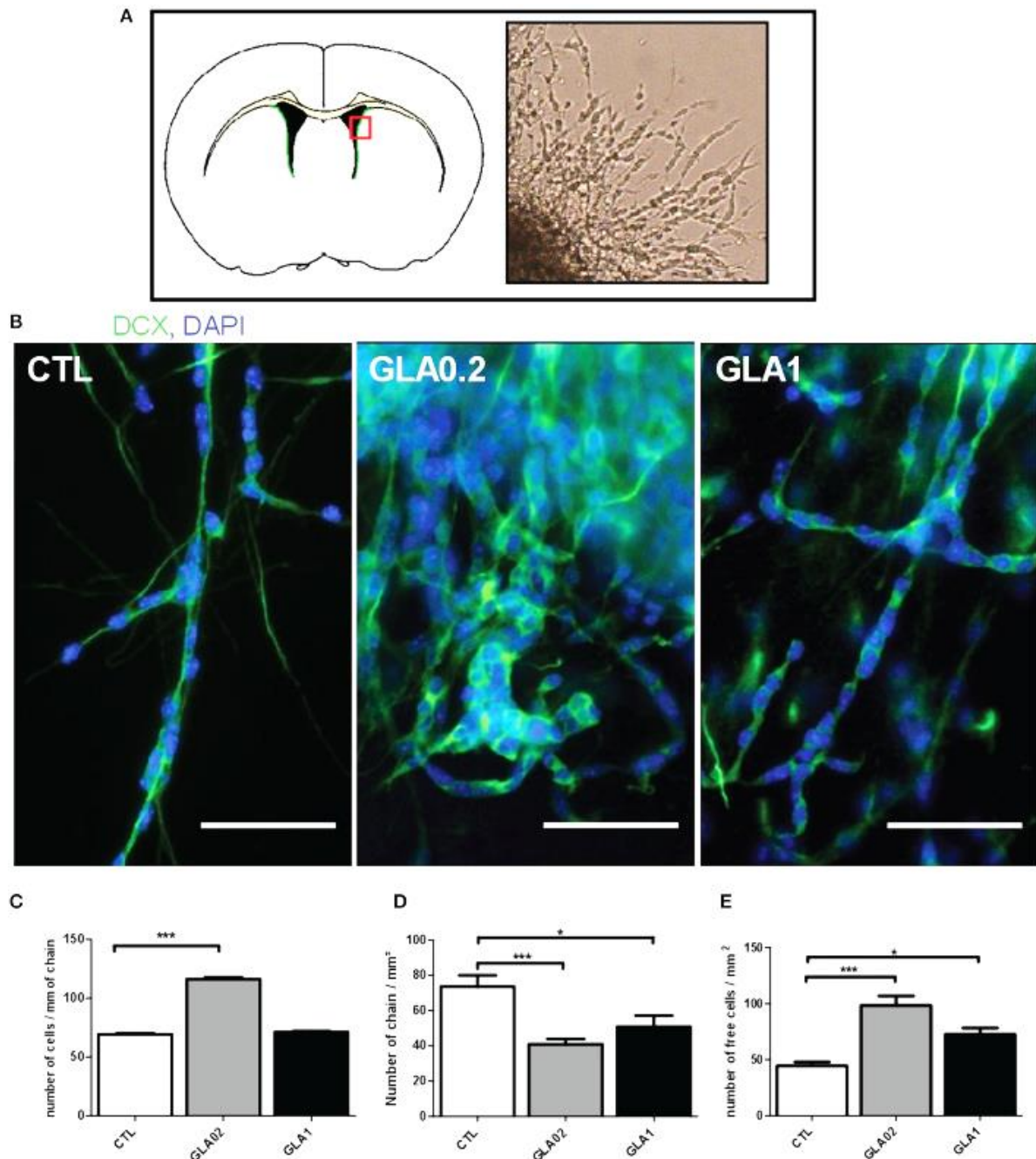


Figure 23 : Illustration de l'effet du glufosinate d'ammonium sur la neurogenèse via culture *ex vivo* d'un explant de SVZ provenant de souris exposées en périnatale. (A) Schéma d'une section coronale de la SVZ (zone verte) ; les explants ont été micro-disséqués dans la partie désignée par le carré rouge ; à droite, photographie obtenue avec un microscope inversé de culture. (B) L'apparence morphologique des neuroblastes et des chaînes formées a été étudiée par immunocytochimie, via DCX pour marquer les neuroblastes (vert) et les noyaux via le marquage DAPI (bleu). Les résultats montrent des cellules fusiformes bipolaires classiques en contact les unes avec les autres dans les conditions contrôles. Contrairement à GLA0.2, les GLA1 montrent des extensions et des ramifications du cône de croissance, une perte de bipolarité et un aspect anormal et des chaînes compactes. Le nombre de cellules par unité de distance a été mesuré dans les chaînes formées et montre une augmentation significative de ce nombre dans GLA0.2 mettant en évidence l'agrégation (C). Le nombre de chaînes formées (D) ou de cellules individuelles (E) a été compté. Le nombre de chaînes formées dans les explants de souris exposées à GLA0.2 et GLA1 est significativement plus faible par rapport aux CTL. Par conséquent, le nombre de cellules libres isolées est significativement plus élevé chez les souris exposées (197).

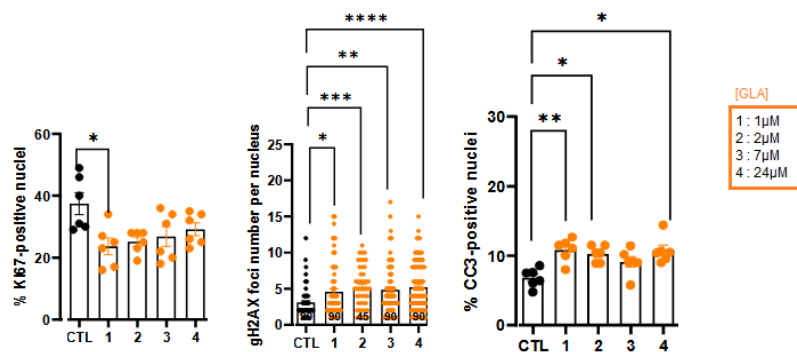


Figure 24 : Effet du glutosinate d'ammonium (GLA) sur la prolifération cellulaire, la génotoxicité et les phénomènes apoptotiques sur culture primaire embryonnaire de cellules souches (Feat-Vetel et al., in preparation)

- Effets sur la différenciation cellulaire

Les résultats *in vitro* publiés par Feat-Vetel et al. (200) démontrent que le GLA et son principal métabolite affectent la différenciation des cellules souches neurales et perturbent l'épithélium épendymaire. Le glutosinate modifie l'orientation de la différenciation cellulaire des NSCs *in vitro* et contribue aux changements des proportions de population : en présence de glutosinate d'ammonium et de son métabolite, la population de cellules C est régulée à la baisse tandis que les populations de progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC) et de neuroblastes sont augmentées (Figure 25).

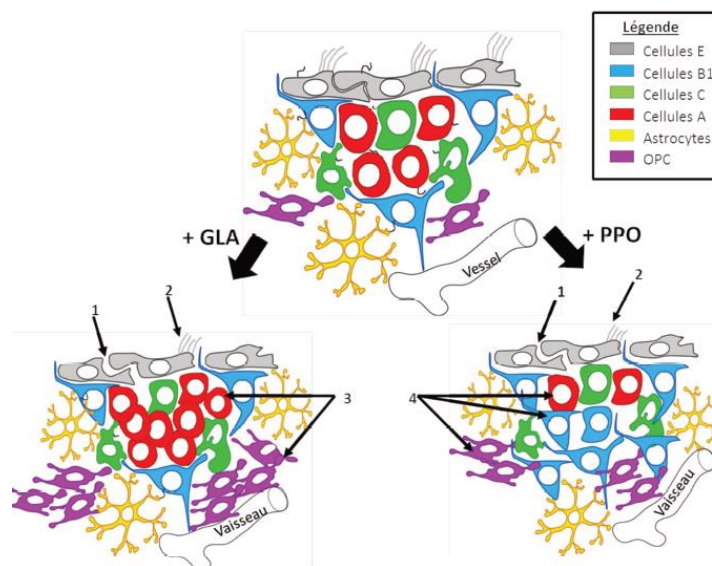


Figure 25 : Effets du glutosinate d'ammonium sur la différenciation des populations cellulaires de la SVZ (200)

Par ailleurs, pour un autre type cellulaire, les épendymocytes ou cellules épendymaires (cellules E) sont des cellules gliales du système nerveux central. Elles bordent le canal de l'épendyme et les ventricules cérébraux. Ce sont des cellules épithéliales dont la fonction est d'assurer l'interface entre le système

nerveux et le LCR. Les cellules E multiciliées recouvrent la paroi latérale des ventricules cérébraux latéraux et forment ainsi une interface protectrice entre le LCR et le parenchyme cérébral (201). Par conséquent, les cellules E maintiennent le microenvironnement de la niche neurogénique SVZ. Une précédente étude du laboratoire démontre que l'exposition au GLA ou à son métabolite (PPO) perturbait les cellules E, indiquant que le GLA et son métabolite PPO a un impact significatif sur la formation et le maintien de la niche neurogénique SVZ *in vitro* (200).

La toxicité de la toxine BMAA, du glyphosate et du glufosinate d'ammonium peut être notamment être expliquée par leur analogie structurelle d'acides aminés. La BMAA est en effet considérée comme un analogue de la sérine, et du glutamate en présence de l'ion bicarbonate (202). Le glyphosate est un analogue structurel de la glycine. Bien que cela soit discuté, le GLY provoquerait un mauvais repliement protéique, en s'incorporant dans les chaînes polypeptidique ; le glufosinate d'ammonium est également un analogue du glutamate (203). Ainsi, ces trois molécules ont probablement la capacité d'interagir avec des cibles moléculaires communes.

III) Interactions des molécules naturelles et anthropiques avec les systèmes glutamatergiques

1. Le glutamate

Le glutamate (Glu, E) est un acide aminé protéinogène non-essentiel. Le caractère "non-essentiel" signifie qu'il peut être synthétisé *de novo* par l'organisme et qu'il ne nécessite pas d'être apporté via l'alimentation. Le glutamate est d'une importance fondamentale pour le métabolisme des acides aminés. Il est également nécessaire à la synthèse de molécules clés, telles que le glutathion. Dans le système nerveux central, le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur et son produit, le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur.

A) Synthèse du glutamate

Le glutamate est classé comme un acide aminé non essentiel, ce qui signifie qu'il peut être synthétisé en quantité adéquate par l'organisme (204). Le glutamate peut être synthétisé de deux manières distinctes. Tout d'abord, il peut être synthétisé à partir de l' α -kétoglutarate, via la glutamate déshydrogénase. Deuxièmement, le glutamate peut être synthétisé à partir d'autres acides aminés, la « famille des glutamates » d'acides aminés comprend la glutamine, l'arginine, la proline et l'histidine (Figure 26).

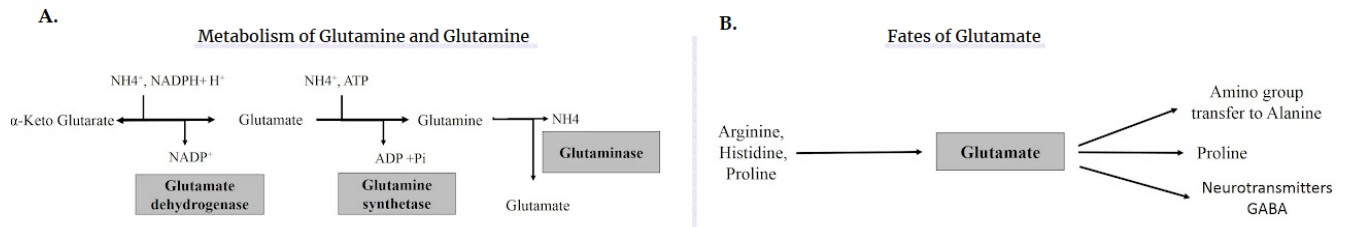


Figure 26 : Synthèse du glutamate. (A) Métabolisme de la glutamine et du glutamate. (B) Synthèse du glutamate à partir de l'arginine, l'histidine, la proline et devenir du glutamate (205)

B) Rôle du glutamate dans la synthèse protéique

Le glutamate est incorporé dans les protéines au fur et à mesure de leur synthèse, mais il peut être ajouté en tant que modification post-traductionnelle après synthèse, sous la forme de queues polyglutamylées. Par exemple, la polyglutamylation de la tubuline affecte son interaction avec d'autres protéines, telles que les protéines associées aux microtubules (MAP) (206). Le glutathion est un tripeptide, composé de trois acides aminés : le glutamate (acide glutamique), la cystéine et la glycine. Notons que deux sont les analogues structuraux du glufosinate et du glyphosate respectivement. Le glutathion (c-glutamyl-cystéinyl-glycine) est un antioxydant intracellulaire majeur présent dans pratiquement tous les tissus. La première étape de sa synthèse est catalysée par la glutamate cystéine ligase qui relie le glutamate à la cystéine. La GSH synthase forme ensuite une liaison peptidique entre la c-glutamyl-cystéine et la glycine pour donner du glutathion (207). Le glutathion réduit/glutathion oxydé forme une paire redox qui est importante dans le maintien de l'équilibre redox intracellulaire. Toutes les cellules sont soumises à un certain niveau de stress oxydatif ; les peroxydes sont réduits par le GSH, catalysé par la GSH peroxydase, pour protéger la cellule des dommages oxydatifs. Le glutathion oxydé formé est ensuite réduit en GSH par la GSH réductase afin qu'il n'y ait pas de perte de GSH.

C) Rôle du glutamate dans la signalisation cellulaire du SNC

Le glutamate possède un rôle important dans le métabolisme des acides aminés (208). Le rôle le plus connu et étudié du glutamate est son rôle de signalisation.

a) Les récepteurs au glutamate

La plupart des neurones et des cellules gliales expriment différents récepteurs au glutamate à leur surface. La stimulation des récepteurs est dépendante de la concentration de glutamate dans le milieu extracellulaire environnant. Cette concentration doit être régulée et ne pas être excessive car toxique à des concentrations élevées. Les récepteurs au glutamate sont alors activés de façon excessive, et cela peut entraîner une excitotoxicité (209). Les récepteurs du glutamate comprennent deux grandes sous-classes : les récepteurs ionotropes et les récepteurs métabotropes. Les récepteurs ionotropes du

glutamate sont des canaux ioniques ligand-dépendants, tandis que les récepteurs métabotropes du glutamate sont des récepteurs couplés aux protéines G (210).

Les récepteurs ionotropiques

Un récepteur ionotrope est une protéine membranaire qui ouvre un canal ionique par la liaison d'un messager chimique ou d'un neurotransmetteur. Ils sont situés notamment au niveau des synapses, où ils convertissent un message chimique pré-synaptique (neurotransmetteur) en un message électrique post-synaptique. Les récepteurs ionotropes s'opposent aux récepteurs métabotropes, qui ne possèdent pas de canaux ioniques.

- **Les récepteurs de type AMPA**

Parmi les récepteurs ionotropes du glutamate, les récepteurs du glutamate de type NMDA et de type AMPA sont les plus étudiés en raison de leurs rôles physiologiques.

Les récepteurs AMPA sont directement activés par la liaison du glutamate ; aucun autre ligand, endogène, n'a été découvert à ce jour. Ils sont principalement exprimés dans la membrane neuronale postsynaptique et jouent un rôle dans la neurotransmission excitatrice rapide dans le réseau cérébral. Les récepteurs AMPA sont des tétramères composés de quatre types de sous-unités (GluA1 à GluA4), et peuvent être homo- ou hétéro-tétramères. La sous-unité GluA2 est le déterminant de la perméabilité au calcium. Les récepteurs AMPA imperméables au calcium contenant GluA2 sont principalement exprimés dans les neurones de projection excitateurs (210), tandis que les récepteurs AMPA perméables au calcium (sans la sous-unité GluA2) sont principalement exprimés dans les interneurones inhibiteurs (211). L'expression des récepteurs AMPA perméables au calcium a également été observée au niveau des synapses neuronales excitatrices dans des conditions de plasticité synaptique, y compris la plasticité physiologique et après une agression pathologique (212). L'expression du récepteur AMPA n'est pas restreinte aux neurones ; tous les types de cellules gliales expriment des récepteurs AMPA (213). Les niveaux d'expression dans les astrocytes peuvent varier selon les circonstances, y compris l'inflammation (214). La microglie et les macrophages expriment également des récepteurs AMPA, contribuant à la libération de cytokines pro-inflammatoires (215). L'ensemble des données de la littérature suggère que le AMPA peut avoir divers rôles physiologiques et pathologiques.

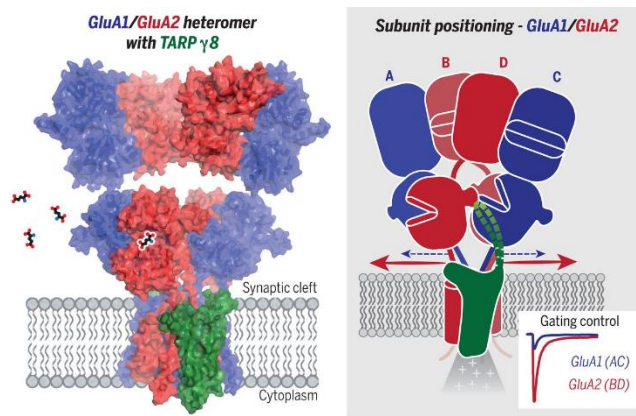


Figure 27 : Organisation d'un hétéromère du récepteur GluA1/2 AMPA associé à TARP $\gamma 8$. Le récepteur GluA1/2 AMPA avec deux sous-unités auxiliaires TARP $\gamma 8$ (vert) est représenté avec une association schématique de son agoniste, le glutamate (à gauche). Les sous-unités GluA1 (bleu) et GluA2 (rouge) s'arrangent préférentiellement à des positions différentes dans le tétramère (à droite), conférant à GluA2 un meilleur contrôle du déclenchement du canal. (Encart) Contributions représentatives au flux d'ions glutamate-dépendant. Une boucle $\gamma 8$ (ligne pointillée) interagit avec le domaine de liaison au ligand GluA2 pour influencer le déclenchement du récepteur (216).

- Les récepteurs de type NMDA

Le récepteur NMDA est un acteur clé de la transmission excitatrice et de la plasticité synaptique du système nerveux central. Les récepteurs NMDA existent principalement dans la membrane postsynaptique, mais sont également exprimés dans les membranes présynaptiques. La distribution des récepteurs NMDA ne se limite cependant pas aux neurones ; les astrocytes expriment également des récepteurs NMDA. Ceux-ci comprennent deux sous-unités GluN1 avec soit deux sous-unités GluN2, soit une combinaison de sous-unités GluN2 et GluN3. Ils nécessitent de la D-sérine (et non de la glycine) pour agir comme co-agonistes pour l'activation (217). La D-sérine est libérée notamment, au sein du SNC, par les astrocytes (218). Une telle contribution des astrocytes ajoute une preuve supplémentaire à leurs rôles dans la plasticité synaptique.

L'acide quinolinique et l'acide kynurénique sont connus depuis quelques années pour être respectivement un agoniste et un antagoniste endogène des récepteurs NMDA (219).

Les cellules gliales astrocytaires ont longtemps été considérées uniquement comme des cellules de soutien structurelles et métaboliques qui ne participent pas directement au traitement de l'information dans le cerveau. Les découvertes de la réactivité des astrocytes au glutamate libéré par voie synaptique et leur capacité à libérer des agonistes des récepteurs du glutamate ont donné naissance à des études approfondies sur les communications gliales-neurones. Les récepteurs astrogliaux du glutamate, en particulier de types NMDA, également les mGluR3 et mGluR5, peuvent activer une variété de cascades moléculaires entraînant une modulation astrogliale des niveaux extracellulaires de glutamate et de l'activité des récepteurs neuronaux du glutamate (217,220). La communication glutamatergique

bidirectionnelle entre les astrocytes et les neurones sous-tend une modulation complexe et spatialement distribuée de la signalisation synaptique contribuant ainsi à l'enrichissement du traitement de l'information par les réseaux neuronaux. La fonction astrocytaire n'est pas complètement comprise et nécessite des recherches supplémentaires pour renforcer notre compréhension des mécanismes et de la pertinence physiologique des interactions glutamatergiques astrocytes-neurones, en particulier la capacité des astrocytes à activer directement les récepteurs neuronaux du glutamate en libérant du glutamate et, sans doute, de la D-sérine – mis en avant par les travaux d'Aude Panatier en 2006 –. Ainsi, la signalisation astrogliale glutamatergique, à la fois neuroprotectrice et pathogène, pourrait avoir un rôle clé dans la survenue de maladies neurologiques et neurodégénératives (221). Les récepteurs au NMDA sont ainsi exprimés dans les neurones, les astrocytes et également par les oligodendrocytes ainsi que la microglie (222).

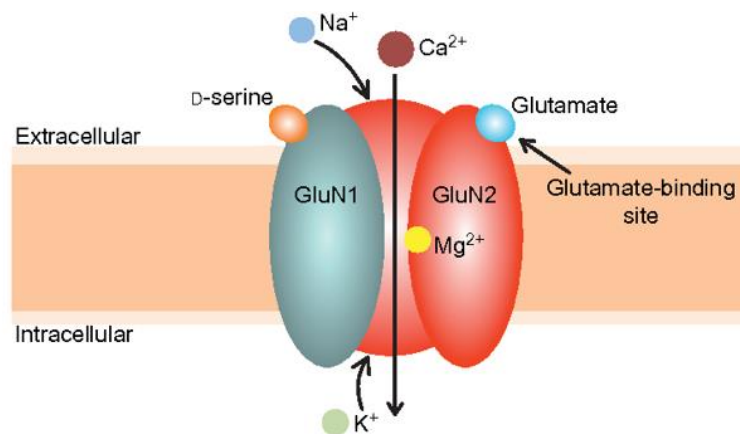


Figure 28 : Structure du récepteur NMDA. Le canal ionique NMDAR conventionnel est hétérotétramère, constitué de deux sous-unités GluN1 et deux GluN2. L'activation du NMDAR nécessite, en plus de la liaison à son agoniste, le glutamate (1) une dépolarisation post-synaptique, qui soulage le blocage Mg^{2+} du canal et (2) de la D-la sérine, devant être liée au site modulateur de la glycine sur la sous-unité GluN1. Lors de l'ouverture du canal NMDAR, le calcium (Ca^{2+}) et le sodium (Na^{+}) pénètrent dans le neurone, tandis que le potassium (K^{+}) sort (adapté de (223)).

Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques sont couplés à des molécules associées à la membrane appelées protéines G trimériques. L'activation du récepteur entraîne la dissociation de la protéine G qui va alors interagir directement avec un canal ionique ou bien déclencher une cascade de signalisation intracellulaire impliquant différentes protéines effectrices. La distribution étendue des protéines mGluR suggère que ces récepteurs neuromodulateurs ont la capacité de participer à de nombreuses fonctions dans l'ensemble du SNC et peuvent représenter des cibles idéales pour une intervention thérapeutique dans une grande variété de troubles du SNC.

Les huit mGluR, mGluR1-mGluR8, sont des récepteurs couplés à la protéines G (RCPG) qui existent sous forme de dimères constitutifs (224). Les mGluR sont divisés en sous-familles des groupes I, II ou III

(Table 6). À l'exception de mGluR6, qui est principalement exprimé dans un type de cellules particulier de la rétine, les mGluR sont largement exprimés dans tout le système nerveux (225).

Groupe	Récepteurs	Expression dans le SNC	Localisation synaptique	Signalisation cellulaire
Groupe I	mGluR1	Neurones	Prépondérance post-synaptique	Stimule la phospholipase C (PLC); stimulation de l'adenylyl cyclase (quelques cas); phosphorylation des MAPK
	mGluR5	Neurones, astrocytes	Prépondérance post-synaptique	
Groupe II	mGluR2	Neurones	Pré-synaptique et post-synaptique	Inhibition de l'adenylyl cyclase; activation des canaux K ⁺ ; inhibition des canaux Ca ²⁺
	mGluR3	Neurones, astrocytes	Pré-synaptique et post-synaptique	
Groupe III	mGluR4	Neurones; forte présence dans le cervelet	Prépondérance pré-synaptique	Inhibition de l'adenylyl cyclase; activation des canaux K ⁺ ; inhibition des canaux Ca ²⁺
	mGluR6	Rétine	Post-synaptique (cellules rétinienne bipolaires « ON »)	
	mGluR7	Neurones	Prépondérance pré-synaptique	Stimulation de cGMP phosphodiesterases (mGluR6)
	mGluR8	Neurones; moins abondamment que les mGluR4 et mGluR7	Prépondérance pré-synaptique	

Table 6 : Principales caractéristiques des mGluR (226).

b) Les antagonistes des GluR

Les iGluR et les mGluR sont apparus comme des cibles médicamenteuses potentielles pour un certain nombre de troubles, notamment la schizophrénie, la dépression et la toxicomanie.

De façon intéressante, l'administration de kétamine, un antagoniste des NMDAR non compétitif, fonctionne comme un antidépresseur avec des effets rapides et durables. Cela suggère une implication des GluR dans la dépression (227).

Des ligands considérés comme agonistes sont des molécules qui interagissent avec le récepteur et induisent les mêmes effets que le ligand naturel. Les antagonistes sont des molécules qui interagissent avec le récepteur et bloquent l'action du ligand en prévenant le changement conformationnel du complexe; ils peuvent avoir une action compétitive ou non-compétitive. Un ligand orthostérique peut se comporter comme agoniste ou antagoniste en se fixant au site de liaison du ligand (agoniste) naturel. Un ligand allostérique est un agoniste ou antagoniste se fixant à un site autre que celui du ligand naturel entraînant un changement de conformation ayant pour conséquence soit une augmentation (effecteur positif, « PAM »), soit une diminution (effecteur négatif, « NAM ») de l'activité du ligand naturel.

Afin d'étudier les voies de signalisation cellulaire, et déterminer si les effets induits par une molécule impliquent des GluR, une pré-incubation avec un antagoniste peut être envisagée. Les antagonistes et les NAM (*Negative Allosteric Modulators*) sont résumés ici, de façon non exhaustive (Table 7).

Ligands antagonistes pharmacologiques des NMDAR		
Composés	Cible	Activité
Ketamine	NMDA	Antagoniste
Methadone	NMDA	Antagoniste
Mementine	NMDA	Antagoniste
Amantadine	NMDA	Antagoniste
Dextrometorphan	NMDA	Antagoniste
MK-801	NMDA	Antagoniste
CGP 39551	NDMA	Antagoniste
Ligands antagonistes pharmacologiques des AMPAR		
LY 303070 (GYKI 53784)	AMPA	Antagoniste
LY300168 (GYKI 53655)	AMPA	Antagoniste
Selurampanel (BGG492)	AMPA/kainate	Antagoniste
Perampanel	AMPA	Antagoniste
CQNX	AMPA/kainate	Antagoniste
NBQX	AMPA/kainate	Antagoniste
L-701,324	AMPA	Antagoniste
<i>(bloque son site de liaison à la glycine)</i>		
Ligands antagonistes pharmacologiques non sélectifs des mGluR		
LY341495	Groupe II > Groupe III > Groupe I	Antagoniste orthostérique
<i>Ligands des mGluR de groupe I et II</i>		
(S)-MCPG	Groupe I/Groupe II	Antagoniste orthostérique
LY367385	Groupe I/Groupe II	Antagoniste orthostérique
CPCCOEt	mGluR1	NAM
Bay 36-7620	mGluR1	NAM
JNJ16259685	mGluR1	NAM
FTIDC	mGluR1	NAM
YM 298198	mGluR1	NAM
SIB-1757	mGluR5	NAM
SIB-1893	mGluR5/mGluR4	NAM/PAM
MPEP	mGluR5/mGluR4	NAM/PAM
MTEP	mGluR5	NAM
<i>Ligands des mGluR de groupe III</i>		
CPPG	Groupe III	Antagoniste orthostérique
MAP4	Groupe III	Antagoniste orthostérique
MMPIP	mGluR7	NAM

Table 7 : Liste non exhaustive des molécules pharmacologiques ciblant les NMDAR, AMPAR et mGluR (226)

Il existe une grande diversité d'antagonistes pharmacologiques qui ont été développés pour cibler les récepteurs au glutamate (Table 7). Certains d'entre eux induisent des effets secondaires, non désirés. La gravité et la fréquence des effets secondaires dépendent de l'affinité pour le récepteur. Par exemple, les effets indésirables des antagonistes du NMDA sont principalement des effets sur le SNC. Ils se manifestent par des hallucinations, des étourdissements, de la fatigue, des maux de tête, des sensations extracorporelles, des cauchemars et des changements sensoriels.

Les trois molécules présentées précédemment, c'est-à-dire la toxine BMAA, le glyphosate et le glufosinate d'ammonium sont considérées comme des analogues d'acides aminés et peuvent interagir avec les récepteurs au glutamate (173,200,228). Un nombre croissant d'études alertent sur les conséquences de l'exposition à ces composés, notamment concernant leurs effets sur les cellules souches neurales.

Chapitre 2 :

Neurogenèse secondaire et niches neurogéniques

I) Neurogenèse et gliogenèse

Les neurones et cellules gliales du SNC proviennent des cellules souches neurales (NSCs, *Neural stem cells*). La neurogenèse désigne la formation d'un neurone fonctionnel et son intégration au sein du système nerveux. La gliogenèse est décrite comme la génération de cellules gliales (non neuronales) dérivées des NSCs. Les cellules de la glie sont les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales. Ces cellules constituent la "neuroglie". Ce terme a été proposé en 1859 par Rudolph Virchow. Il voit alors ces cellules comme de la "colle nerveuse" qui retiendrait les neurones ensemble dans le SNC. Dans le système nerveux périphérique (SNP), les cellules gliales sont essentiellement composées des cellules de Schwann. Ainsi, après la génération des NSCs, elles peuvent soit entrer en neurogenèse, soit en gliogenèse soit rester dans un état multipotent. Ces processus sont d'une part réalisés pendant l'embryogénèse (neurogenèse primaire) mais également tout au long de la vie de l'individu (neurogenèse secondaire) dans certaines régions spécifiques du cerveau.

1. Neurogenèse primaire

Les NSCs situées dans le tube neural se multiplient massivement et se différencient pour former la totalité des cellules gliales et des neurones du système nerveux (Figure 29). Ce processus permet de former un nombre important de neurones (229). Chez l'être humain la neurogenèse embryonnaire en tant que telle survient entre la 10^e et la 20^e semaine de gestation. Chez les espèces murines tels que la souris, les premiers neurones se forment au jour embryonnaire 10 (E10). Aux alentours de E17, la neurogenèse primaire est terminée. Les cellules progénitrices neurales peuvent alors entrer en gliogenèse. Contrairement aux cellules neuronales, qui perdent la capacité de se diviser, les cellules gliales peuvent continuer à proliférer localement. Ainsi, après la neurogenèse embryonnaire, le système nerveux central est constitué de plusieurs milliards de cellules. Pour l'espèce humaine, on estime à 10¹³ le nombre de neurones et jusqu'à 10 fois plus de cellules gliales.

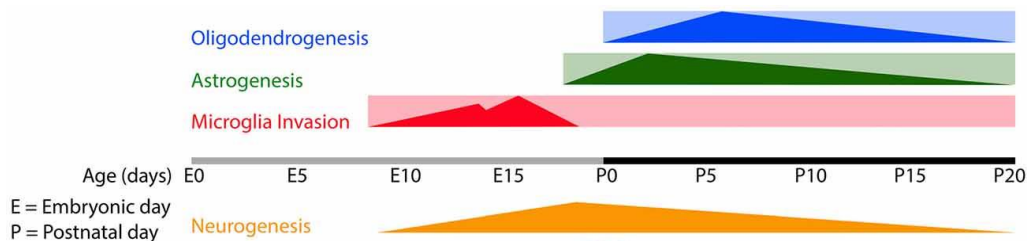


Figure 29 : Chronologie de l'invasion de la microglie, de la gliogenèse et de plusieurs processus de développement dans le cerveau murin (souris) en cours de développement. Les rectangles indiquent les périodes estimées pendant lesquelles la microglie, les astrocytes et les oligodendrocytes restent présents dans le cerveau. Les triangles indiquent les pics des processus de développement indiqués (230).

2. Neurogenèse secondaire

A l'âge adulte, le cerveau demeure en mesure de fabriquer des neurones pouvant s'intégrer aux réseaux existants. On parle de neurogenèse secondaire. Il y a quelques années, il était supposé qu'aucune neurogenèse n'avait lieu lorsque le système nerveux central était mature. En d'autres termes, que notre contingent de neurones s'était constitué pendant notre développement embryonnaire et pendant les premières années de la vie post-natale. C'est notamment une étude menée en 2002, qui montre qu'en injectant du bromodésoxy-uridine (BrdU) chez des mammifères primates non-humains de nouvelles cellules neuronales étaient générées à partir de NSCs (231). Quelques années plus tôt et chez des humains adultes, ce même marquage avait permis de visualiser des nouvelles cellules neuronales au sein de l'hippocampe (232).

Physiologiquement, la faculté de produire de nouvelles cellules participe à la plasticité cérébrale. Cela permet de s'adapter aux changements qui surviennent dans l'environnement, et de répondre à d'éventuelles lésions ou maladies. Deux régions cérébrales, nommées "niches neurogéniques" sont capables de neurogenèse secondaire : la zone sous granulaire du gyrus denté (SGZ) de l'hippocampe (Figure 30), ainsi que la SVZ (Figure 31). Il est à préciser que les nouveaux neurones produits sont essentiellement des interneurons.

A) Au niveau de l'hippocampe

Dans l'hippocampe, la neurogenèse adulte a lieu au niveau du gyrus denté (DG) précisément au sein de la SGZ. Les cellules souches neurales produisent, par division asymétrique, des cellules progénitrices (cellules de type II). Celles-ci prolifèrent puis se différencient en neuroblastes et migrent dans la couche granulaire (Figure 31). Ces neuroblastes se différencient majoritairement en neurones excitateurs. L'hippocampe produit également des interneurons du gyrus denté ainsi que des astrocytes.

L'hippocampe possède un rôle important dans la consolidation de l'information, ainsi que dans la mémoire à long et à court terme et dans l'espace, la navigation. Depuis la découverte de la neurogenèse adulte dans le gyrus denté de l'hippocampe chez les rats (233) et les humains (232), de nombreuses

études se sont attachées à identifier la mise en place et le fonctionnement de cette niche neurogénique. A l'heure actuelle, il est supposé que les niveaux élevés et faibles de neurogenèse adulte soient adaptatifs – une neurogenèse élevée favoriserait ainsi la discrimination et une neurogenèse faible favorise la généralisation (234).

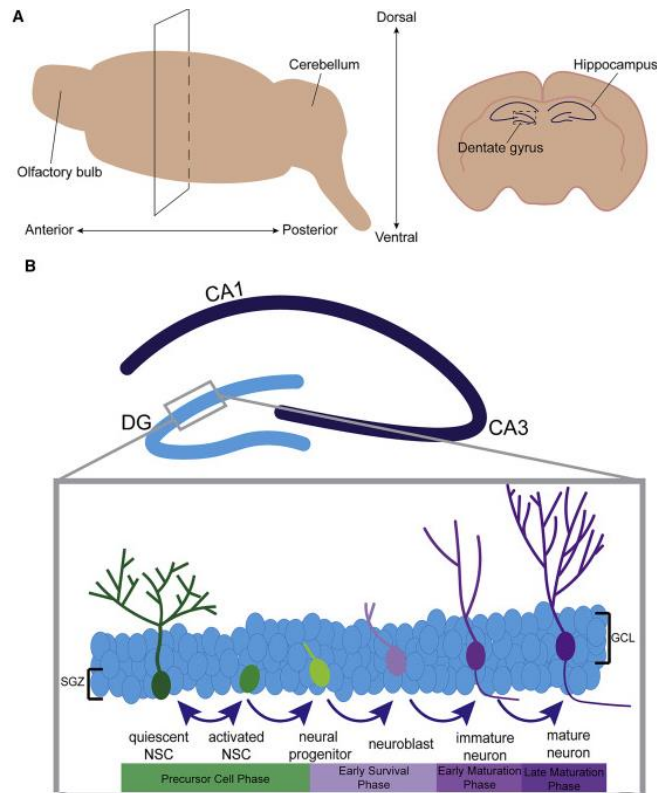


Figure 30 : Neurogenèse hippocampique adulte chez la souris. (A) Représentation de l'hippocampe de la souris. Le panneau de gauche illustre une coupe coronale à travers l'hippocampe dorsal d'un cerveau de souris. Le panneau de droite est une coupe coronale à travers l'hippocampe dorsal. (B) Représentation schématique de la neurogenèse hippocampique adulte chez la souris. Les NSCs génèrent des cellules filles qui retournent au repos pour l'auto-renouvellement du pool de NSC ou se différencient en neurones. Les progéniteurs neuronaux qui survivent mûrissent en neurones granulaires et s'intègrent dans les circuits de l'hippocampe (235)

La neurogenèse dans le gyrus denté (DG) de l'hippocampe est importante chez les mammifères, elle est essentielle pour certaines formes d'apprentissage et de mémoire (232).

B) La zone sous-ventriculaire

La SVZ génère des neuroblastes, qui sont des interneurons immatures, capables de migrer jusqu'aux bulbes olfactifs où ils vont se différencier en interneurons fonctionnels.

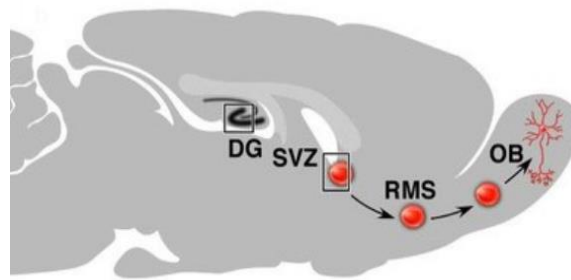


Figure 31 : Représentation d'un cerveau de souris adulte (coupe sagittale). Sont représentées les deux zones principales de neurogenèse secondaire : le gyrus denté de l'hippocampe (DG) et la zone sous-ventriculaire (SVZ) ainsi que la migration des neuroblastes de la zone sous-ventriculaire au bulbe olfactif (OB) par un mécanisme migratoire (Rostro-migratory stream, RMS) (236)

Dans le cerveau adulte murin, la plus grande population de NSCs, les cellules B1, se trouvent dans la SVZ. Les cellules B1 sont les NSCs, multipotentes et capables de s'auto-renouveler. Elles ont la capacité de générer les "cellules progénitrices" intermédiaires appelées cellules C. Ces dernières se divisent à leur tour pour générer un grand nombre de jeunes neurones, les "cellules A", qui entreprennent une migration longue et complexe vers les bulbes olfactifs. Elles vont être importante pour le fonctionnement de cette structure qui est le premier relais du système nerveux central pour le traitement des informations olfactives.

Les cellules C sont également capables de produire des cellules progénitrices d'oligodendrocytes (OPC). La SVZ représente une source endogène importante d'OPC, capable de préserver la population d'oligodendrocytes qui va participer à la réparation des lésions démyélinisantes. La SVZ est donc une zone hétérogène en termes de populations cellulaires. Par des analyses de *single-cells RNA*, une équipe a cherché à mieux comprendre cette hétérogénéité. A partir de micro-dissection, ils ont souligné la diversité des cellules présentes, et identifié des sous-populations de cellules A définies notamment par leur état de maturation (237). Grâce aux marqueurs connus des différents types cellulaires, ils ont retrouvé les principaux types cellulaires caractéristiques de la SVZ : cellules B1, progéniteurs intermédiaires (cellules C), et neuroblastes (cellules A). En outre, ils ont également identifié des groupes de cellules correspondant aux astrocytes, aux cellules épendymaires, aux neurones, à l'oligodendrogliose, à la microglie, aux péricytes, aux cellules musculaires lisses vasculaires et aux cellules endothéliales (Figure 32). L'organisation cellulaire est ici schématisée (Figure 33). Les différents types cellulaires et leur fonction sont également abordés.

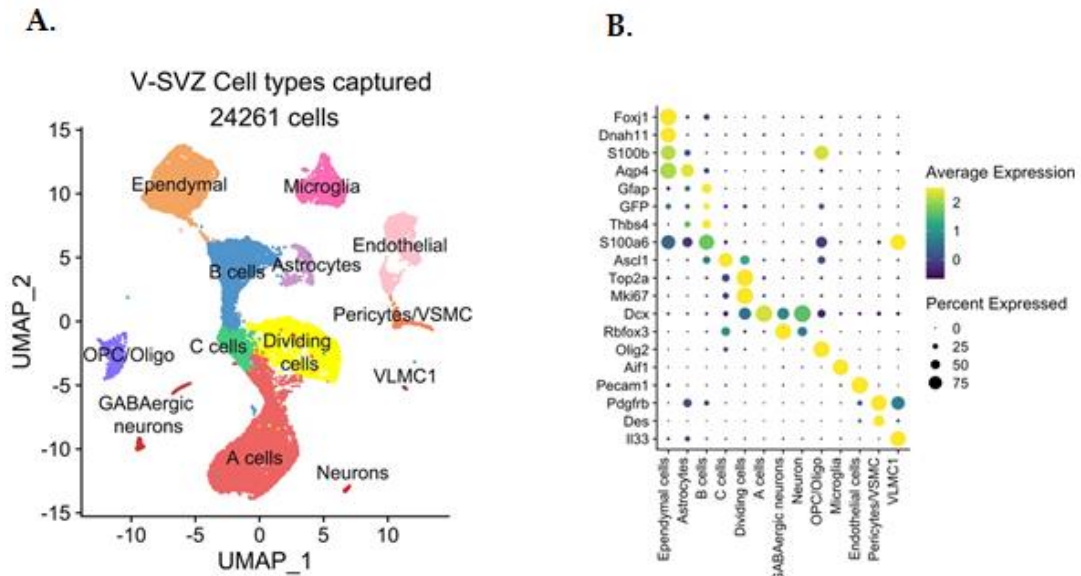


Figure 32 : Populations cellulaires identifiées après micro-dissection de la V-SVZ. (A) Tracé UMAP des types de cellules (B) Dot plot de l'expression des marqueurs spécifiques des types de cellules dans les clusters de (A). VSMC : Vascular Smooth Muscle Cells ; VLMC1 : Vascular Leptomeningeal cells (237).

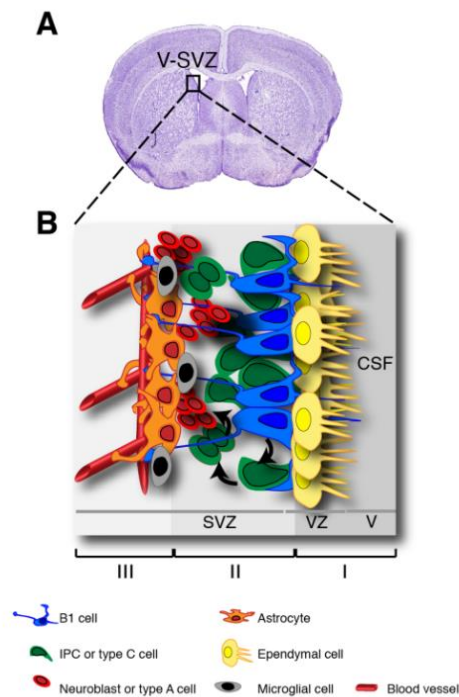


Figure 33 : Représentation schématique de la niche V-SVZ et SGZ. (A) Coupe coronale du cerveau de souris adulte montrant la localisation de la SVZ. (B) Composition du domaine cellulaire B1 dans la SVZ. Les cellules B1 (bleues) s'étendent du domaine proximal (domaine I, gris foncé) au domaine distal (domaine III, gris clair). Au niveau des ventricules, les cellules B1 entrent en contact avec le CSF/LCR avec leur cil primaire au centre d'une rosette de cellules épendymaires multiciliées (jaune), formant les structures typiques de « pinwheel » sur la surface ventriculaire. Dans le domaine distal, les cellules B1 entrent en contact avec les vaisseaux sanguins (rouge) avec leurs terminaisons spécialisées en pied. Dans le domaine intermédiaire (ou domaine II), les cellules de type B1 donnent naissance aux cellules C (vertes), qui sont des cellules amplificatrices de transit générant des neuroblastes (ou cellules de type A, rouges).

a) Les cellules épendymaires

Les cellules épendymaires (cellules E) dérivent de la glie radiaire pendant le développement embryonnaire. Les cellules E sont des cellules gliales ciliées cuboïdes qui forment une couche continue tout au long de la paroi des cavités du système ventriculaire cérébral et spinal. Ces cellules développent des cils motiles, mesurant jusqu'à 20µm. Au niveau de la niche neurogénique, les épendymocytes sont regroupés autour des cellules souches B1, formant un "pinwheel". L'intégrité de l'épendyme est critique pour la neurogenèse de la SVZ. En effet, l'épendyme participe à la création d'un micro-environnement neurogénique essentiel à la niche SVZ en sécrétant notamment des facteurs influençant la différenciation cellulaire et en faisant office de barrière. Les épendymocytes ne sont pas renouvelés à l'âge adulte.

b) Les cellules B1

Les cellules B1, également appelé "astrocytes de type B1" proviennent de la glie radiaire. Elles possèdent une forme "spider-like". Ces cellules se divisent de façon symétrique pour maintenir le *pool* de cellules souches puis se divisent de façon asymétrique pour générer les progéniteurs intermédiaires, les cellules C à l'origine des différents types cellulaires. Les cellules sont ainsi en contact étroit avec les cellules E (Figure 33). Les cellules B1 ont des marqueurs communs avec les astrocytes matures. En effet, les cellules B1 expriment la GFAP (*glial fibrillary protein*), GLAST (*glutamate aspartate transporter*), Sox2, Nestin ou encore ACSA2 (*astrocyte cell surface antigen-2*) (238,239). Les marqueurs de différenciation associés aux types cellulaires sont illustrés dans le Chapitre 2.

Les cellules B1 possèdent trois domaines distincts :

1. Le domaine I (proximal) contient le cil primaire et est en contact direct avec le LCR. Dans ce domaine, les cellules B1 peuvent accéder aux facteurs solubles dans le LCR dont les molécules de signalisation des cellules épendymaires voisines et du plexus choroïde
2. Le domaine II (intermédiaire) correspond à la zone d'interaction entre les cellules B1 et les autres types cellulaires de la niche neurogénique. C'est également au sein de cette zone que certains neurotransmetteurs tels que le glutamate et le GABA vont contribuer à la neurogenèse (240)
3. Le domaine III (distal) comprend un processus basal se terminant par un pied terminal spécialisé qui entre en contact avec les vaisseaux sanguins. C'est par ce domaine que les facteurs transmissibles par le sang et les facteurs dérivés de l'endothélium peuvent agir sur les cellules B1.

c) Les cellules C

Les cellules C, ou progéniteurs intermédiaires, sont les cellules qui prolifèrent le plus activement au sein de la SVZ. Ces cellules ont un noyau plus imposant, ainsi qu'une forme "globulaire". Les cellules C expriment notamment la protéine Nestine, ainsi que le marqueur GLAST. Ces foyers de cellules proliférantes sont à proximité des chaînes de type A, les neuroblastes (241).

d) Les neuroblastes

Dans le cerveau postnatal sain, la neurogenèse et la migration cellulaire sont limitées à quelques régions spécifiques évoquées précédemment : les niches neurogéniques. Ces zones sont la SGZ du gyrus denté dans l'hippocampe (233), la SVZ bordant le ventricule latéral qui fournit des cellules ayant pour destination les bulbes olfactifs (BO) (242) et le cervelet (233). Ainsi, les neuroblastes de la SVZ sont des cellules très mobiles qui migrent vers des régions cérébrales cibles depuis leur lieu de naissance pour devenir des neurones et s'intégrer dans des réseaux neuronaux. Lors de la migration cellulaire, les neuroblastes ne migrent pas de manière continue (243).

En cas d'altération du SNC, la neurogenèse de la SVZ est augmentée. On observe alors une prolifération des cellules souches, et une localisation des neuroblastes nouvellement générés au niveau des lésions (244). Ces neuroblastes sont Ki67⁺ (marqueurs du pouvoir prolifératif) et DCX⁺ (Doublecortine, marqueur spécifique des neuroblastes). Dans le cadre d'accident ischémique, ces neurones immatures sont capables d'intégrer le réseau préexistant et, ultérieurement, de former des synapses fonctionnelles (245).

e) Les précurseurs d'oligodendrocytes (OPC, *Oligodendrocytes precursors cells*)

Les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC. Ils sont générés à partir des OPC, produites issues des progéniteurs gliaux (cellules C). Cette différenciation est notamment guidée par libération de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) (246). Les oligodendrocytes matures, myélinisants, ont la capacité de synthétiser de grande quantité de myéline, qui s'enroule autour des axones du SNC, formant ainsi la gaine de myéline. Il existe de nombreux marqueurs qui déterminent le stade de différenciation oligodendrogliale, reflétant ainsi leur stade de développement, les plus représentés sont résumés dans la Figure 35.

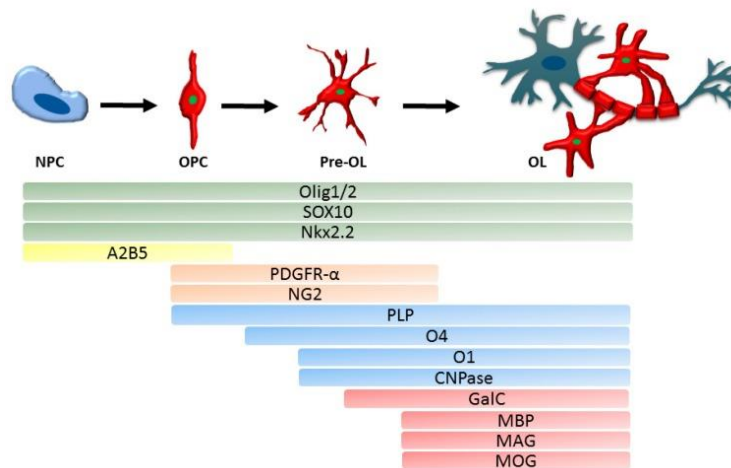


Figure 34 : Représentation des marqueurs de différenciation des oligodendrocytes. Depuis les cellules progénitrices neuronales (NPC, Neural Progenitors Cells) aux oligodendrocytes myélinisants (OL). OPC : oligodendrocyte progenitor cells ; PDGFR- α : platelet-derived growth factor receptor A ; NG2 : neuron-glia antigen 2 ; PLP : proteolipid protein ; CNPase : 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase ; MBP : myelin basic protein ; MAG : myelin associated glycoprotein ; MOG : myelin-oligodendrocyte glycoprotein ; GalC : galactocerebroside (247)

Les segments de myéline sont séparés par des espaces où la membrane des axones est directement en contact avec le milieu extracellulaire : ce sont les nœuds de Ranvier. Ceux-ci ont été décrits pour la première fois par Louis-Antoine Ranvier au Collège de France en 1871. Ces nœuds permettent la conduction saltatoire de l'influx nerveux.

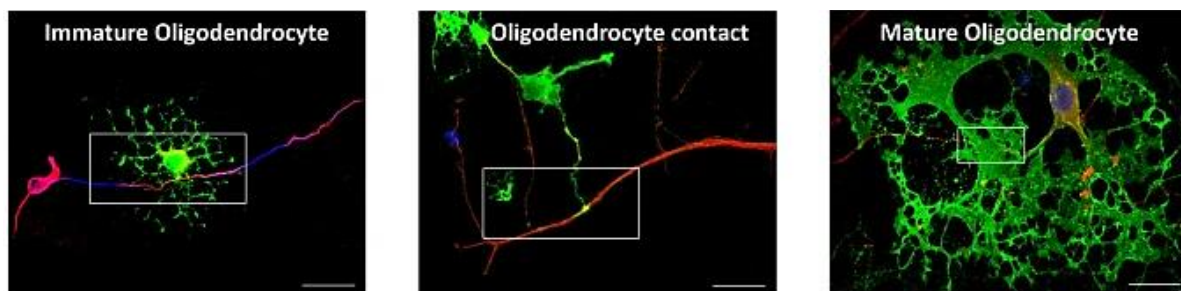


Figure 35 : Photographie d'immunocytochimie représentant le degré de myélinisation selon la différenciation oligodendrogliale. La tubuline acétylée (bleu) et MBP (vert) ont été respectivement utilisées pour marquer les axones et la myéline. Barre d'échelle = 25 μ m (248)

f) Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales abondantes du SNC des mammifères. Les astrocytes proviennent des NSCs de la SVZ et peuplent tout le cerveau en migrant le long des processus gliaux radiaux (249).

Les astrocytes ont de nombreuses fonctions au sein du SNC. Entre autres, les astrocytes sont des contributeurs actifs à la formation et au maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE, Figure 36), qui sépare la circulation sanguine périphérique du microenvironnement hautement contrôlé du SNC (Abbott 2006). De plus, les astrocytes sécrètent des facteurs neurotrophiques pour réguler la synaptogenèse, la différenciation neuronale et la survie neuronale (250). Une fois les synapses

neuronaux établies, les astrocytes modulent activement la transmission synaptique par la libération et la recapture des neurotransmetteurs et la régulation de la concentration en ions extracellulaires (251).

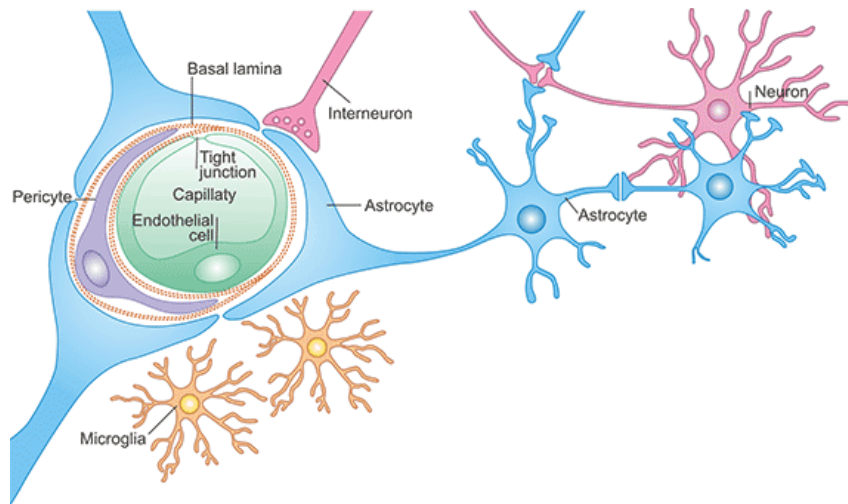


Figure 36 : Représentation des associations cellulaires formant la BHE. Les cellules endothéliales forment des jonctions serrées qui scellent la voie de diffusion paracellulaire aqueuse entre les cellules. Les péricytes sont distribués de manière discontinue le long des capillaires cérébraux et entourent partiellement l'endothélium. Les pieds astrocytaires (podocytes) forment un réseau entourant les capillaires et cette association cellulaire étroite est importante dans le maintien des propriétés de barrière (252).

Les cellules astrocytaires produisent, *in vivo* et *in vitro*, un très grand nombre de facteurs de croissance. Ces facteurs agissent seuls ou en combinaison pour réguler sélectivement la morphologie, la prolifération, la différenciation, la survie, des populations neuronales. La production de facteurs de croissance et de cytokines par les astrocytes et leur réactivité à ces facteurs est un mécanisme majeur sous-jacent à la fonction de développement et à la capacité de régénération du SNC. En effet, les astrocytes sont considérés, avec les cellules microgliales, comme les cellules immunocompétentes au sein du SNC. Cela signifie que ces cellules peuvent avoir un rôle important lors des phénomènes neuro-inflammatoires.

Les astrocytes sont des régulateurs cruciaux des réponses immunitaires innées et adaptatives dans le système nerveux central lésé. Selon le moment et le contexte, l'activité des astrocytes peut exacerber les réactions inflammatoires et les lésions tissulaires, ou favoriser l'immunosuppression et la réparation des tissus. D'un point de vue mécanistique, la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B est une étape centrale dans l'activation des astrocytes et contribue à la progression de certaines pathologies du SNC (253). La translocation nucléaire de NF- κ B dans les astrocytes est déclenchée par des stimuli pro-inflammatoires tels que le facteur de nécrose tumorale TNF α et l'interleukine IL-1 β , les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (254), la myéline phagocytée (255), l'engagement des récepteurs de type *Toll* (TLR) (256) et d'autres facteurs associés à l'inflammation du SNC. En réponse à leur activation, les astrocytes sécrètent certaines cytokines telles que l'IL-6.

Un réseau neurone-glie en étroite communication est une condition préalable essentielle au bon fonctionnement du SNC (257,258). Les astrocytes, la microglie et leurs interactions contrôlent l'homéostasie physiologique du SNC (259,260). La communication bidirectionnelle entre les astrocytes et la microglie module l'inflammation du SNC par la sécrétion de multiples cytokines et médiateurs inflammatoires. Par exemple, Liddelow et ses collègues (260) ont rapporté que la microglie activée par le LPS induisait un phénotype toxique dans les astrocytes réactifs.

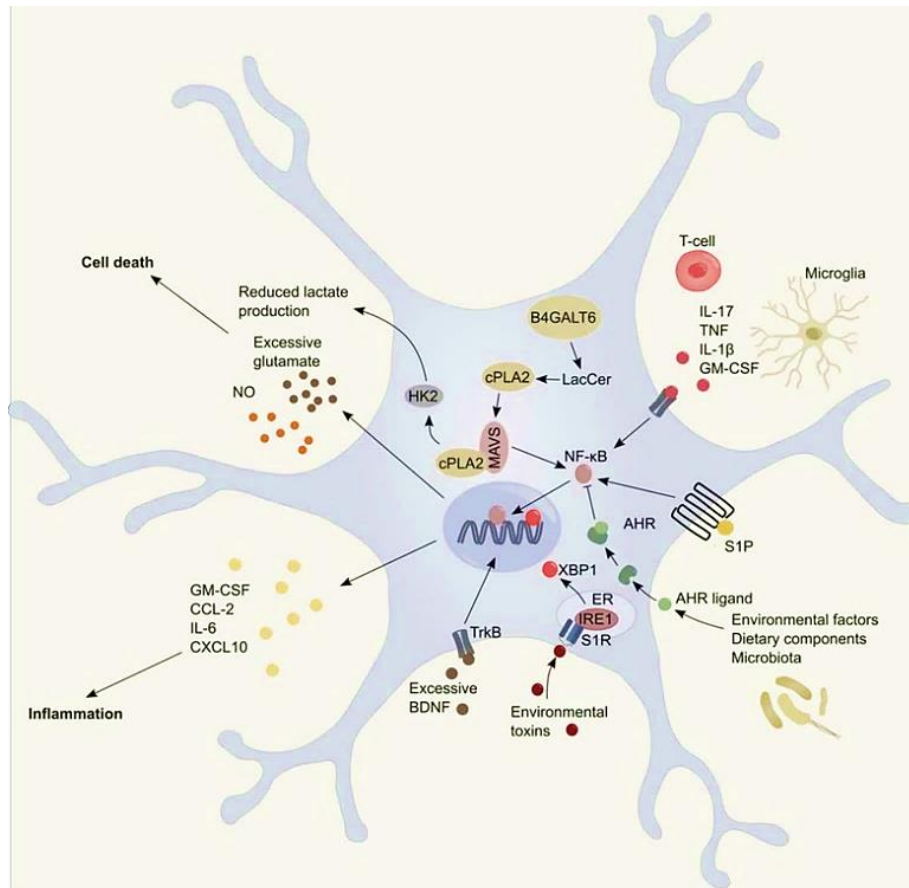


Figure 37 : Signalisation des astrocytes dans un contexte neuro-inflammatoire. Le facteur de transcription NF-κB contrôle de multiples aspects des réponses pro-inflammatoires des astrocytes. La signalisation NF-κB est déclenchée/stimulée par les cytokines libérées entre autres par la microglie ; dans ce contexte, les astrocytes produisent certaines cytokines telles que l'IL-6 (261).

g) Les cellules microgliales

La microglie constitue environ 10 à 15 % de toutes les cellules gliales. La microglie est souvent désignée comme correspondant aux macrophages résidant du SNC. Les cellules microgliales proviennent du sac vitellin et peuplent le SNC avant sa vasculogenèse (262). Les microglies au « repos » (« *resting microglia* ») sont dans un état de surveillance. Pour effectuer leur rôle de surveillance, elles possèdent ainsi de nombreuses ramifications (Figure 38). Dans le cadre de leurs fonctions homéostatiques, les corps cellulaires microgliaux restent stationnaires, mais leurs prolongements balayent en permanence

l'espace extracellulaire environnant et communiquent directement avec les neurones, les astrocytes et les vaisseaux sanguins. Cet état de mouvement perpétuel leur permet de réagir rapidement aux dommages ou à l'infection en s'orientant vers un phénotype activé, exerçant ainsi des fonctions inflammatoires. A l'état activé, les cellules microgliales adoptent plutôt une forme amiboïde, présentes également au cours du développement (263). Les microglies activées *in vitro* et *in vivo* interagissent étroitement avec les NSCs résidentes des niches neurogènes distinctes. La microglie activée a des effets différentiels sur la prolifération, la migration et la différenciation des NSCs (264). Des transformations de la morphologie, du phénotype et de la fonction microgliales sont observées dans de nombreuses pathologies du système nerveux central, telles que les accidents vasculaires cérébraux, les lésions cérébrales au sens large et également dans le cadre de maladies neurodégénératives.

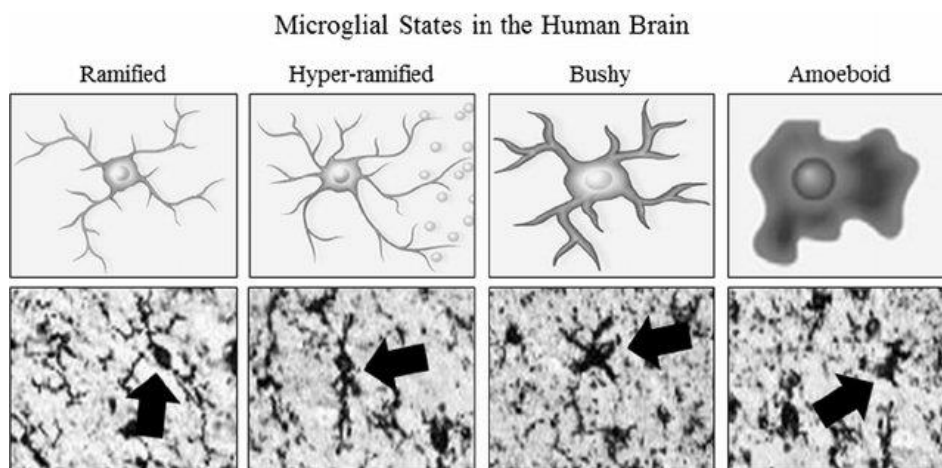


Figure 38 : Morphologie de la microglie. Schémas représentatifs et photomicrographies de la microglie du cerveau humain (immunohistochimie Iba1) illustrant les étapes morphologiques de l'activation microgliale. Les microglies ramifiées ou "au repos" sont caractérisées par de longs processus ramifiés avec des corps cellulaires relativement petits. Les microglies hyper-ramifiées légèrement activées sont caractérisées par une ramification accrue des processus ainsi que par un allongement des processus et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. La morphologie touffue (« bushy ») est une activation intermédiaire et se caractérise par des processus gonflés et tronqués et des corps cellulaires agrandis. Les microglies amiboïdes ou « phagocytaires » sont caractérisées par une morphologie arrondie semblable à un macrophage avec peu ou pas de processus et sont associées à une activation pro-inflammatoire maximale ; cet état d'activation peut s'accompagner d'une apoptose microgliale (265)

Il a été démontré que la microglie a des rôles cruciaux et distincts au cours du développement, y compris la régulation de la différenciation cellulaire et la neurogenèse. La microglie phagocyte plusieurs produits cellulaires de cellules mortes, mourantes et vivantes. Son pouvoir phagocytaire peut être mesuré par l'expression du marqueur CD68 (266). Si la sécrétion de l'IL-6 est majoritairement astrocytaire, la microglie est en mesure de sécréter un ensemble de cytokines telles que l'IL-1 β et le TNF α modulant les événements neurodéveloppementaux (267,268). Lors de l'étude des effets de composés exogènes sur la neurogenèse, il apparaît crucial de s'intéresser à leurs pouvoirs neuro-inflammatoires. L'étude de ces procédés consiste, entre autres, à évaluer la libération des médiateurs de l'inflammation par les cellules

dites « immuno-compétentes », à caractériser les modifications morphologiques de ces cellules et à déterminer leur statut d'activation ainsi que leur prolifération.

Chapitre 3 :

Phénomènes neuro-inflammatoires

1) La Neuro-inflammation

La neuro-inflammation est un processus qui se produit dans le SNC, impliquant une réponse immunitaire et inflammatoire dans le cerveau et la moelle épinière. Elle est étroitement liée à plusieurs aspects :

- **Réponse immunitaire** : La neuro-inflammation implique l'activation de cellules immunitaires spécifiques dans le système nerveux central, notamment les cellules microgliales et les astrocytes, en réponse à une atteinte du SNC. Cette réponse immunitaire peut être bénéfique dans la lutte contre les infections et la réparation des tissus endommagés. En revanche, si elle devient excessive ou chronique, elle peut entraîner des dommages supplémentaires aux cellules nerveuses.
- **Impact sur les maladies neurologiques** : La neuro-inflammation est en effet étroitement liée à de nombreuses maladies neurologiques telles que la MA, la sclérose en plaques, la MP et la SLA. Dans ce contexte, la neuro-inflammation peut aggraver les symptômes et contribuer à la progression de la maladie. D'un autre côté, l'activation des cellules microgliales permet une phagocytose importante des plaques A β dans le cadre de la MA (269). Ainsi, selon le stade de la pathologie, l'administration d'anti-inflammatoires n'est pas systématiquement salvatrice pour un patient atteint de MND.
- **Barrière hémato-encéphalique (BHE)** : La neuro-inflammation peut altérer l'intégrité et donc la fonction de la BHE, qui est une barrière protectrice entre la circulation sanguine et le cerveau. L'activation des cellules immunitaires et la libération de médiateurs inflammatoires peuvent entraîner des changements dans la perméabilité de la BHE, permettant ainsi le passage de substances potentiellement nocives dans le cerveau.

Ainsi, la neuro-inflammation est importante à considérer en raison de son rôle dans la réponse immunitaire, son impact sur les maladies neurologiques, son influence sur la BHE et sa contribution aux dommages causés par les traumatismes cérébraux. Comprendre les mécanismes de la neuro-

inflammation peut conduire au développement de nouvelles stratégies de traitement pour atténuer les effets néfastes de l'inflammation sur le système nerveux.

1. Généralités

Ainsi, les microglies sont des cellules immunitaires résidentes du SNC qui jouent un rôle important dans la régulation du développement cérébral. Elles sont entre autres responsables de l'élimination des cellules mortes, des synapses redondantes, des agrégats de protéines. De plus, en tant que source de cytokines pro-inflammatoires, la microglie est un médiateur essentiel de la neuro-inflammation et peut induire ou moduler un large spectre de réponses cellulaires. En effet, bien que l'on est longtemps cru le SNC était immunoprivilégié, protégé des agressions extérieures par la BHE, aujourd'hui, l'existence de phénomènes neuro-inflammatoires régulés ne fait aucun doute.

La neuro-inflammation est définie comme la mise en place de processus inflammatoires dans le cerveau et/ou la moelle épinière. Cette inflammation est médiée par la production de cytokines, de chimiokines, d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de messagers secondaires (270). Ces médiateurs sont notamment produits par les cellules gliales résidentes du SNC (microglie et astrocytes). Ces réponses impliquent le système immunitaire et peuvent avoir des conséquences immunitaires, physiologiques, biochimiques et psychologiques. Il est nécessaire de souligner que le degré de neuro-inflammation et ses conséquences dépendent du contexte, de la durée et de l'évolution et de la nature du stimulus primaire. Ces médiateurs sont produits et libérés principalement par les cellules dites « immunocompétentes ». En effet, si les neurones et les oligodendrocytes participent à la neuro-inflammation, les principaux acteurs restent les cellules microgliales ainsi que les astrocytes. Ces cellules sont, entre autres, à vocation immune. L'activation de la microglie et des astrocytes est hétérogène, canonique, et traditionnellement classée comme neurotoxique (microglie de phénotype M1 et astrocytes de phénotype A1) ou neuroprotectrice (microglie de phénotype M2 et astrocytes de phénotype A2) (271). Cependant, cette classification apparaît comme trop simpliste, dichotomisée, et est susceptible de ne pas refléter les différents phénotypes de la microglie et des astrocytes (272). La neuro-inflammation est au cœur de plusieurs neuropathologies aiguës et chroniques. En effet, une neuro-inflammation excessive et prolongée est susceptible d'avoir des effets néfastes sur la fonction cellulaire et/ou cérébrale, et créer un terrain favorable à la progression des maladies du SNC. Il est également important de considérer ces phénomènes indépendamment du contexte pathologique du fait qu'ils interviennent aussi dans des contextes physiologiques normaux.

1. Implication des phénomènes neuro-inflammatoires dans les neurogenèses secondaires

Les cytokines pro-inflammatoires ont un rôle important dans la plasticité synaptique (273), la neurotransmission (274), ainsi que la neurogenèse (275). Des études ont démontré que les cellules souches neurales ont la capacité de répondre aux signaux inflammatoires (276). Il est admis que l'inflammation nuit à la neurogenèse secondaire des mammifères (275,277). Une étude publiée en 2006 appuie ce lien étroit entre le système immunitaire et les neurogenèses secondaires, hippocampique et subventriculaire (278). Chez des souris immunodéficientes, le réapprovisionnement en lymphocytes T (cellules clés de l'immunité) a restauré une neurogenèse secondaire normale. De plus, leurs résultats suggèrent que les lymphocytes T ont un rôle non seulement dans la prolifération des cellules progénitrices mais aussi pour la différenciation neuronale. En effet, le rapport entre les nouveaux neurones (cellules BrdU+ DCX+) et le nombre total de cellules proliférantes (BrdU+) était significativement plus faible chez les souris nues que chez le type sauvage (Figure 39a-b). Par ailleurs, l'arborisation dendritique des neurones immatures apparaissait rigoureusement différente entre les souris sauvages et les souris nues (Figure 39c) (278). Lorsqu'ils ont transféré des splénocytes, contenant une population normale de cellules lymphocytes T matures, aux souris nues le rapport des cellules BrdU+ DCX+ au nombre total de cellules BrdU+ était significativement plus élevé dans le gyrus denté des souris nues reconstituées que dans ceux des souris nues n'ayant pas bénéficiés de transfert de cellules immunitaires (Figure 39d-e). Il faut retenir par ailleurs qu'il existe un niveau basal de production et d'émission de cytokines pro-inflammatoires qui participent à l'homéostasie dans le SNC (279). De façon générale, les cytokines peuvent avoir un effet neuroprotecteur ou, à l'inverse être neurotoxique. La neuro-inflammation est donc finalement à double tranchant, notamment en terme de neurogenèse (277).

a) L'Interleukine-6

Les fonctions physiologiques de l'interleukine-6 (IL-6) dans le SNC sont complexes. L'IL-6 exerce des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs, mais peut également fonctionner comme médiateur de l'inflammation, de la démyélinisation et de l'astroglie, selon le contexte cellulaire. Dans le cerveau sain, les niveaux d'IL-6 restent bas. Cependant, une production et une expression élevée peuvent se produire en cas d'inflammation. L'IL-6 est majoritairement produite par les cellules astrocytaires (280,281).

L'IL-6 est un facteur régulateur essentiel de la neuroimmunomodulation dans le système nerveux central, qui protège les neurones et favorise la régénération nerveuse (282). L'IL-6 est également une

cytokine importante impliquée dans l'activité microgliale et les réponses inflammatoires. Selon le microenvironnement du SNC, l'IL-6 peut exercer un effet neurotoxique (283) ou un effet neuroprotecteur (284). En 2003, il a été constaté que l'IL-6 et également le TNF α inhibaient jusqu'à 50 % la neurogenèse hippocampique adulte (275). Des données similaires ont été observées concernant l'effet de l'IL-6 sur la neurogenèse de la SVZ (268).

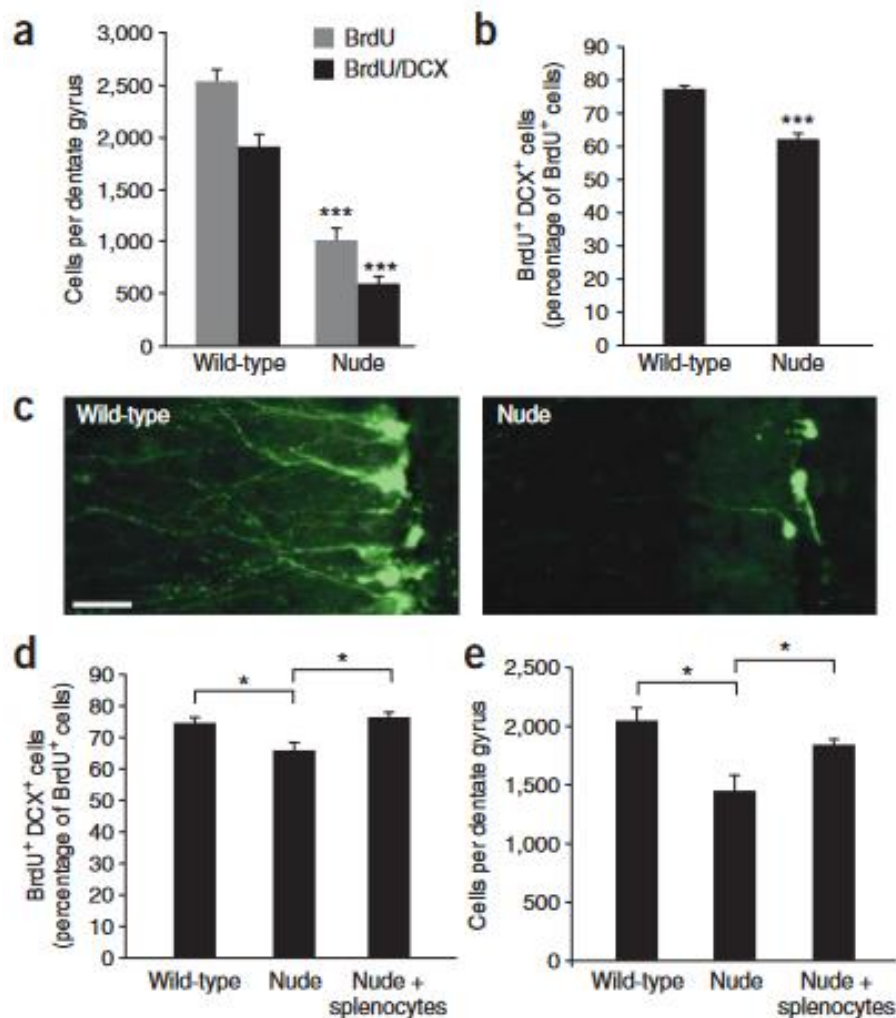


Figure 39 : Altération de la neurogenèse chez des souris déficientes en lymphocytes T. (a) Quantification des cellules BrdU+ et des cellules BrdU+ DCX+ dans le gyrus denté de souris nues et de type sauvage 7 jours après la première injection de BrdU. $***p < 0,001$, test t ; $n = 4$ par groupe. **(b)** Nombre de cellules BrdU+ DCX+ en pourcentage du nombre total de cellules BrdU+ dans le gyrus denté. $***p < 0,001$, test t ; $n = 4$ par groupe. **(c)** Arborisation dendritique des cellules positives à DCX chez des souris de type sauvage et nude. **(d)** Nombre de cellules BrdU+ DCX+ en pourcentage du nombre total de cellules BrdU+ dans le gyrus denté de souris nude de type sauvage, nues et reconstituées en splénocytes, 7 jours après la première injection de BrdU. $*p < 0,05$, test t ; $n = 4$ par groupe. **(e)** Nombre total de cellules PCNA+ dans le gyrus denté de souris nude de type sauvage, nues et complétement en splénocytes $*p < 0,05$, test t ; $n = 4$ par groupe (278)

b) Le Tumor Necrosis Factor α

Le rôle et les conséquences d'un excès de TNF α sont discutés dans la littérature scientifique. Cette cytokine a été identifiée comme délétère pour les NSCs issues de l'hippocampe et de la SVZ (268).

Néanmoins, le TNF α améliore la prolifération des cellules souches neurales adultes (285). En effet, selon les récepteurs et les voies de signalisation impliquées, le TNF α possède des effets neuroprotecteurs ou neurotoxiques. Le TNF α possède deux récepteurs : le TNF-R1 et le TNF-R2. Le TNF-R1 induit un effet neurotoxique et le TNF-R2 induit un effet neurotrophique (286). Il est supposé que la différence d'action entre ces deux types de récepteurs du TNF α provient de leurs structures moléculaires. En effet le TNF-R1 a un domaine baptisé « domaine de la mort », associé avec l'apoptose neuronale, qui n'est pas trouvé dans le TNF-R2 (287). Ranzinger et al. ont montré que la simple fixation mécanique du TNF était suffisante pour activer le TNF-R1 mais pas le TNF-R2 (288). L'activation du TNF-R1 ou du TNF-R2 dépend donc au moins partiellement de la forme dans laquelle le TNF α se trouve (soluble, ou en clusters).

Une étude récente a en effet mis en lumière que les NSCs étaient elles-aussi capables d'être activées. L'inflammation périphérique favorise une activation transitoire des NSCs médiée par TNF α via TNFR2 tandis que le retour à la quiescence semble être dépendante du TNFR1. Ces données identifient que les cellules souches sont capables de réagir à une inflammation systémique (libérant du TNF α). Par ailleurs, dans cette étude, ils ont démontré que l'activation des NSCs lors des processus inflammatoires participaient également à la régénération cellulaire (289).

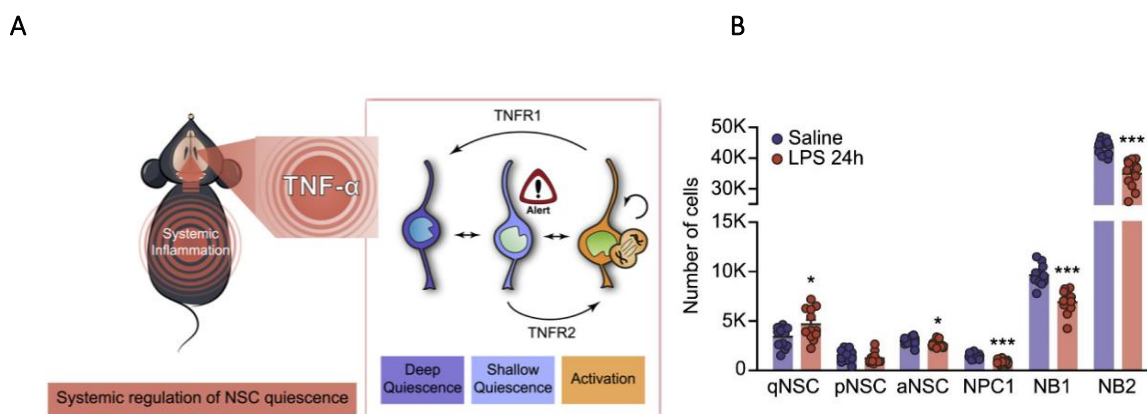


Figure 40 : Effets d'une neuro-inflammation sur la neurogénèse secondaire. (A) Une activation des cellules souches neurales implique les récepteurs du TNF α . (B) Une neuro-inflammation induite par le LPS modifie les populations de cellules souches et celles en différenciation. (D'après Benlenger et al., 2020).

Les principales cellules du SNC capables de produire le TNF α sont les astrocytes et la microglie (290). Les cellules souches issues de la SVZ en produisent également, via les TLR2 et les TLR4, en réponse à un stimulus pro-inflammatoire (291). En effet, les NSCs réagissent à la stimulation du TLR3 par le poly(I:C), en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 mais pas le TNF α ; la microglie, elle réagit aux ligands des TLR (*Toll-like receptors*), les TLR3 et du TLR4 (par l'exposition au Poly(I:C) et au LPS, respectivement) (292). Il a été prouvé qu'une stimulation des voies impliquant les TLR2, TLR3 et TLR4 étaient susceptibles d'inhiber la prolifération des cellules NSCs (293).

En résumé, le TNF α est une cytokine avec un large éventail de fonctions : homéostatique, immunitaire et inflammatoire. Les fonctions homéostatiques bénéfiques du TNF α comprennent, entre autres, la défense contre les agents pathogènes, l'inhibition de la croissance tumorale ainsi que la résolution de l'inflammation notamment via la prolifération des NSCs adultes (291). Le TNF α est en mesure d'être autolimitant c'est-à-dire qu'il participe à la résolution d'une neuro-inflammation déclenchée de manière intrinsèque ou extrinsèque par l'élimination de matières toxiques ou de tissus lésés pour restaurer l'homéostasie et la fonction cérébrale. Une activité neuro-inflammatoire incontrôlée peut induire une neuro-inflammation chronique, caractéristique typique de plusieurs maladies neurodégénératives courantes telles que la MA, la MP et la SLA, dans lesquelles l'expression du TNF α semble être régulée à la hausse et peut représenter une cible thérapeutique (294).

c) L'Interleukine-1 β

L'IL-1 β est majoritairement produite par les cellules microgliales activées, en état pro-inflammatoire. L'activation des cellules microgliales est souvent classée comme M1 pour une activation plutôt orientée pro-inflammatoire (neurotoxique) et M2, pour une activation plutôt neuroprotectrice, anti-inflammatoire (295). L'IL-1 β est une isoforme de l'IL-1. En plus des effets néfastes de la microglie activée, les cytokines pro-inflammatoires ont également des effets individuels sur la neurogenèse. Par exemple, l'IL-1 β peut entraîner une déplétion sévère des neuroblastes en modifiant le sort des cellules souches neurales dans la SGZ (296). Il a également été constaté que l'IL-1 β diminue drastiquement la prolifération cellulaire dans le gyrus denté (297). En 2019, une étude a démontré que l'utilisation d'un anti-inflammatoire (pioglitazone), réduisant la production d'IL-1 β , était corrélée avec une amélioration de la neurogenèse et une augmentation du facteur BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) (298). Le BDNF est en effet un facteur de croissance qui est impliqué dans la survie neuronale. Il agit également sur la croissance et la différenciation de nouveaux neurones, les neuroblastes.

La microglie M1 produit des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, telles que TNF α , IL-6, CCL2 et IL-1 β . La microglie M1 exprime également la NADPH oxydase, qui génère des ROS ainsi que de la nitrique oxydase, qui convertit l'arginase en monoxyde d'azote (NO). Le NO augmente l'effet toxique du glutamate, potentialisant ainsi la neurotoxicité médiée par les récepteurs NMDA. L'activation M2 est considérée comme anti-inflammatoire, réparatrice et favorise la libération de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et le *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). La microglie M2 sécrète des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) ainsi que des facteurs neurotrophiques tels que le facteur de croissance nerveuse (NGF), le BDNF et le facteur neurotrophique

dérivé des cellules gliales (GDNF). Les facteurs neurotrophiques engagent une famille de récepteurs tyrosine kinases connus sous le nom de récepteurs Trk, qui régulent la force et la plasticité synaptique. Bien que les catégories M1 et M2 aient été utiles pour conceptualiser les activités de la microglie *in vitro*, il est de plus en plus admis que les phénotypes M1 et M2 sont inadéquats pour décrire l'activation de la microglie et des macrophages *in vivo*. En effet, la microglie affiche rarement un comportement significatif vers le statut M1 ou le M2. Pendant le fonctionnement normal du SNC, la microglie a un profil homéostatique qui reflète une activité de surveillance. Dans les modèles de neurodégénérescence, la microglie exprime à la fois des facteurs neurotoxiques et neuroprotecteurs. Il est important d'avoir en tête qu'une microglie amiboïde, considérée comme « activée », est prédominante au cours du développement du SNC sans induire de neuro-inflammation (263). Les microglies amiboïdes *in vitro* et *in vivo* interagissent étroitement avec les NSCs résidant dans des niches neurogènes distinctes. La microglie activée a en effet des effets différentiels sur la prolifération, la migration et la différenciation des NSCs (264). Pour autant, la forme amiboïde des cellules microgliales peut être associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires (299). Ce constat interroge notamment sur le point de départ pour évoquer le terme de « neuro-inflammation » puisqu'un niveau basal, physiologique, existe et doit être considéré.

Les principales cytokines pro-inflammatoires que nous avons utilisées comme marqueurs sont les interleukines IL-6, l'IL-1 β et le TNF α . Ces trois cytokines sont parfois appelées « triade inflammatoire » car elles exercent leurs effets de façon synergique et redondante. Cette réaction plutôt catégorisée pro-inflammatoire est limitée par la production de cytokines anti-inflammatoires, parmi lesquelles l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β sont les plus connues. L'IL-10 est généralement considérée comme la cytokine immunosuppressive par excellence. Les chimiokines appartiennent aussi aux médiateurs inflammatoires qui sont libérés suite à différentes atteintes du SNC telle que l'inflammation (300). CXCL1 est une chimiokine chémoattractrice pour les lymphocytes T, les monocytes et les neutrophiles dans le cerveau après s'être liée à son récepteur spécifique CXCR2 (301). Il a été démontré que CXCL1 est essentielle pour la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui à leur tour modulent l'inflammation ultérieure (302). Au sein de cette étude, nous nous sommes focalisés sur les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF α .

2. Neuro-inflammation et neurodégénérescence

Un grand nombre de recherches suggèrent que la neuro-inflammation est un événement pathologique clé déclenchant et perpétuant le processus neurodégénératif, pouvant être à l'origine de pathologies. Les processus neurodégénératifs se définissent comme des processus par lesquels le fonctionnement normal du cerveau est altéré par des dommages ou la perte de neurones ou de connexions essentiels

au fonctionnement du cerveau. Différents stimuli, tels que le lipopolysaccharide (LPS), mimant une inflammation bactérienne, sont utilisés pour modéliser la neuro-inflammation associée à la neurodégénérescence. En agissant au niveau des TLR4 (anciennement nommé CD284), le LPS active diverses molécules intracellulaires, qui modifient l'expression d'une myriade de médiateurs inflammatoires. Ces facteurs, à leur tour, initient ou contribuent au développement de processus neurodégénératifs. Le LPS est, entre autres, connu pour réduire les neurites au sein de culture primaires (271), et promouvoir le dépôt de plaque amyloïdes *in vivo* (303). La neuro-inflammation peut précéder le développement de pathologies neurodégénératives telles que la MA, la SLA la MP ainsi que la MH (304,305). La dérégulation de la neurotransmission dopaminergique et l'hypofonctionnement de l'activité des récepteurs NMDA ont été considérés comme des mécanismes fondamentaux de certaines pathologies du SNC (306). Il a également été démontré que la neurotransmission glutamatergique participe à l'amélioration de la neurogenèse dans le cerveau humain (307). Plusieurs études ont rapporté que les antagonistes des récepteurs NMDA, notamment la kétamine et le MK-801, stimulent la neurogenèse hippocampique adulte chez l'animal (308).

Lors d'un épisode neuro-inflammatoire, les récepteurs purinergiques – c'est-à-dire les récepteurs qui sont activés par des purines, en particulier l'ATP et l'ADP – sont impliqués dans la régulation du système immunitaire. Le récepteur P2X7 (P2X7R) est un récepteur potentiellement impliqué dans le développement et la progression des MND. Dans les modèles animaux et chez les patients atteints de la MA, on observe une augmentation de son expression dans les cellules gliales entourant les plaques d'amyloïde bêta (A β). P2X7R est responsable de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (récepteur de type NOD-like contenant un domaine pyrine 3), ce qui entraîne notamment la libération de l'IL-1 β , une cytokine pro-inflammatoire. Cependant, P2X7R peut également présenter des effets neuroprotecteurs. En effet, des études ont montré qu'une stimulation brève de ce récepteur active une protéine appelée α -sécrétase, qui clive la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) de manière non amyloïdogénique. Ce clivage prévient la formation de peptides A β neurotoxiques et produit un fragment soluble, qui possède des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices. De plus, P2X7R joue un rôle dans la phagocytose des peptides A β , contribuant ainsi à leur élimination. Ces multiples fonctions de P2X7R ont conduit à l'hypothèse selon laquelle sa stimulation pourrait avoir un double effet dans la MA : activer la voie neuroprotectrice non amyloïdogénique et/ou entraîner une suractivation des cellules gliales, ce qui provoque une réponse inflammatoire excessive (309). Ces récepteurs sont largement exprimés au sein du SNC, notamment par les cellules microgliales, les oligodendrocytes, les astrocytes ainsi que les cellules souches neurales (310–313).

Le fait que certains polluants de l'environnement (naturels ou anthropiques) sont structurellement des analogues d'acides aminés et sont soupçonnés d'agir en tant qu'agonistes sur les récepteurs du glutamate tels que les NMDA rend l'hypothèse de leur action sur les processus neuroinflammatoires crédibles. Les liens potentiels entre une exposition à des polluants environnementaux et les perturbations de la neurogenèse, en lien avec l'apparition de maladies neurodégénératives est résumé dans la figure 41.

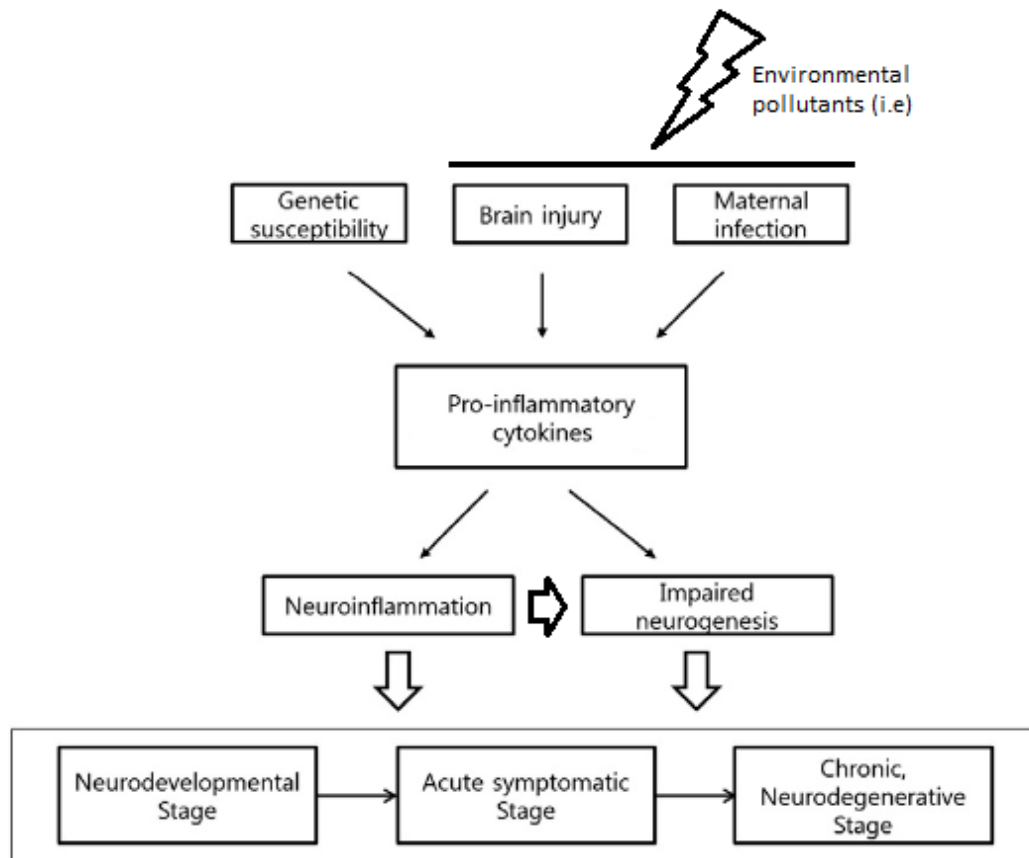


Figure 41 : Liens potentiels déduits entre une exposition à des polluants de l'environnement et l'apparition de perturbations neurologiques.

II) Méthodes d'évaluation

Un objectif important de la toxicologie est de comprendre et de prédire les effets indésirables des médicaments et autres xénobiotiques. Pour l'évaluation toxicologique, plusieurs niveaux d'intégration existent. Les outils *in silico* tels que la modélisation du métabolisme, ou de cinétique peuvent participer à appréhender les mécanismes toxicologiques sous-jacents. D'autres approches expérimentales permettent également de déterminer des valeurs seuil de référence, à savoir les modèles *in vivo* et *in*

vitro. Pour l'ensemble de ces niveaux d'intégration, les approches sont réalisées selon des lignes directrices établies, celles de l'organisation de coopération et de développement économique (OCDE).

1. *In vivo*

Les modèles animaux les plus utilisés dans la recherche fondamentales et académiques sont des modèles rongeurs, tels que la souris, le rat, le cochon d'inde. Ce sont des mammifères qui constituent, en règle générale, de bons modèles en raisons de leurs similitudes physiologiques et moléculaires avec l'espèce humaine. Les primates non-humains (PNH) sont des modèles qui sont parfois utilisés. En effet, par leur origine phylogénétique les PNH présentent une forte proximité avec les humains en termes de patrimoine génétique, de processus épigénétiques, d'organisation fonctionnelle de leur système nerveux et immunitaires. De plus, leurs caractéristiques cognitives et leur comportement, notamment sociaux, ont une proximité certaine avec l'être humain.

L'expérimentation animale permet d'étudier sur un même individu les effets d'une molécule ou d'un extrait sur un organisme entier. L'évaluation prend ainsi en compte toute la physiologie de l'animal ainsi que la métabolisation des substances actives. Puisque de telles études considèrent ainsi l'individu « en entier », la variabilité interindividuelle peut également être considérée. Néanmoins, les résultats – et donc les conclusions – peuvent varier d'une espèce à l'autre. Aujourd'hui, dans les pays Européens et notamment en France, l'expérimentation animale fait l'objet de nombreuses réglementations. Ainsi, la règle des 3R proposée par William Russel et Rex Burch en 1959 a été mise en place. En faveur de la protection animale, elle invite les scientifiques à se questionner sur l'éthique de leur recherche. Les 3R signifient « Remplacer, Réduire, Raffiner ». Un quatrième R s'est récemment ajouté, « Respecter ».

2. *In vitro*

Le « Remplacement » des animaux dans la recherche se réalise notamment par des modèles de culture cellulaire. De ce fait, les modèles *in vitro* sont très largement utilisés. A noter cependant que selon la méthode de culture utilisée, l'utilisation de l'animal reste présente (telle que l'utilisation du sérum de veau fœtal. Parmi les modèles *in vitro*, on distingue les lignées cellulaires des cultures primaires. Les lignées cellulaires sont issues de cellules cancéreuses ou immortalisées, par transfection d'un oncogène viral qui leur permet d'être pérennes. Les cultures cellulaires primaires sont, par définition, directement issues d'un organisme.

- Modèles 2D et 3D

Les systèmes de culture cellulaires sont des outils indispensables pour la recherche fondamentale et appliquée. Les cultures en deux dimensions (« 2D ») sont des cultures monocouches de cellules. Ce

mode de culture est relativement simple et est facilement manipulable. Cependant, les cultures cellulaires 2D, conventionnelles, miment de façon peu fiable les conditions de l'organisme vivant (156,314).

Le premier modèle de culture cellulaire 3D a été mis en place il y a 30 ans, par Petersen et Bissell. Ils ont cherché à reproduire, via des structures organotypiques, les structures mammaires dans les cas cancéreux et non cancéreux (315). Les cultures cellulaires 3D présentent l'avantage de reproduire fidèlement certains aspects des tissus humains, notamment l'architecture, l'organisation cellulaire, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice et les caractéristiques de diffusion les plus pertinentes sur le plan physiologique. L'utilisation des tests cellulaires 3D ajoute de la crédibilité, de la valeur, dans le cadre d'étude toxicologique. Ces modèles – plus délicats à mettre en place que les cultures 2D conventionnelles –, se rapprochent des modèles animaux « complets » (316). En 2021, une étude a mis en avant les différences majeures entre les cultures 2D et les cultures 3D (Table 8,(317)).

Characteristic	2D	3D
Support for cell fixation	Utensils (plastic, polycarbonate)	Extracellular matrix in vitro
Instructions for use	Traditional culture	Imitating the natural microenvironment
Interaction and communication	Cell-cell (co-culture)	Cell-cell and cell-matrix 3D interactions
Cell forms	Flat and extensible	Natural cellular structure preserved
Media cell interface	Homogeneous exposure of all cells to the media	Heterogeneous exposure (the upper layer is more exposed than the lower layer)
Cell junctions	Less common	More common (cell-cell communication)
Cell differentiation	Moderately and poorly differentiated	Well-differentiated
Cell proliferation	Higher proliferation rate than in the natural environment	Medium or high proliferation rate depending on cell type and 3D culture technique
Treatment sensitivity	Cells more sensitive to treatment	Cells less sensitive to treatment
Viability	Sensitive to cytotoxins	High viability and less sensitivity to external factors
Cost	Cheap	Expensive

Table 8 : Tableau comparatif entre les modèles de culture 2D et les modèles de culture 3D (317).

Ainsi, grâce aux modèles *in vitro*, de nombreux paramètres toxicologiques peuvent être évalués. Parmi ceux-ci nous pouvons citer la viabilité cellulaire, la cytotoxicité, la prolifération cellulaire, la mesure de médiateurs de l'inflammation dans le cas de phénomènes neuro-inflammatoires ou encore les processus de différenciation cellulaire. Les interactions entre les NSCs, les neurones, les astrocytes et la microglie influencent de manière cruciale les réponses cellulaire – et notamment neuro-inflammatoires – aux agressions dans le SNC. Les cultures d'astrocytes et de microglies sont des outils intéressants pour modéliser les phénomènes neuro-inflammatoires *in vitro*. Ce modèle de culture a également été mis en place au laboratoire. Selon la question scientifique initiale, ces modèles peuvent

être complétés par la culture multicellulaire, pour mieux modéliser *in vitro* les phénomènes neuro-inflammatoires *in vivo*.

Au sein d'une tri-culture composée de cellules microgliales, de neurones et d'astrocytes, les microglies jouent un important rôle neuroprotecteur lors d'évènements cytotoxiques ((271); Figure 42). En présence de glutamate (25 μ M), les astrocytes au sein de culture dépourvue de microglie démontrent une réactivité caractérisée par une astrogliose et une augmentation significative de la surface de leurs corps cellulaire, ainsi qu'une hypotrophie. Ces modifications n'ont pas été observée au sein de la tri-culture. La viabilité neuronale suite à une exposition au glutamate était également plus importante dans la culture contenant les trois types de cellules que au sein de celle étant dépourvue de microglie. Aussi, les cellules microgliales semblent avoir un effet neuroprotecteur envers les astrocytes et les cellules neuronales suite à l'excitotoxicité induite par le glutamate.

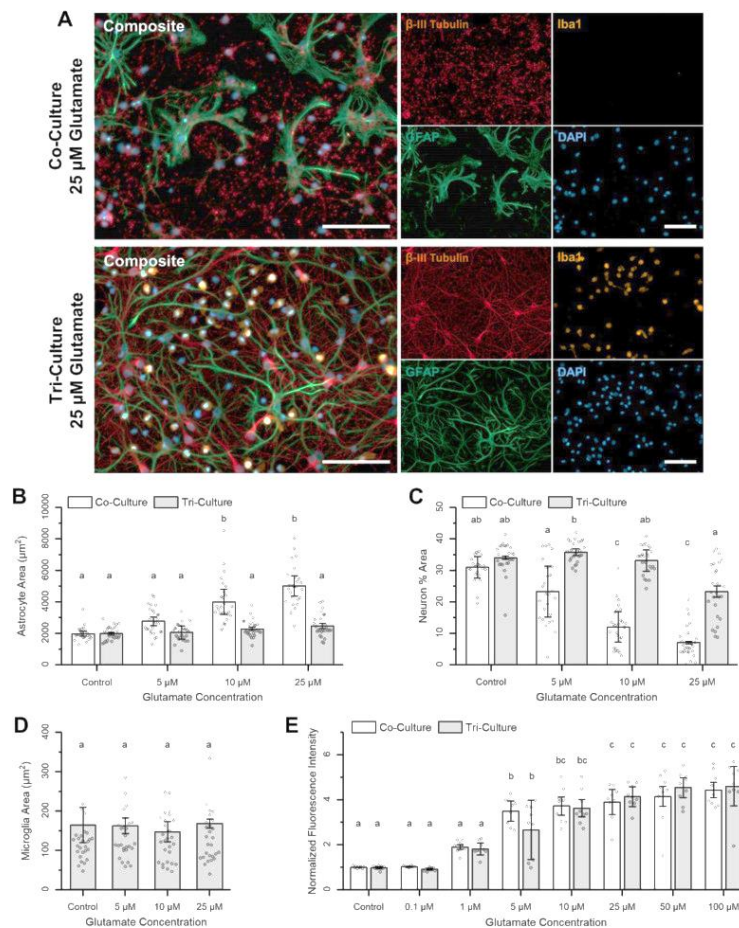


Figure 42 : Réponse à l'excitotoxicité selon le mode de culture. (A) Images de fluorescence représentatives des co- et tri-cultures à 48h après exposition à 25 μ M de glutamate pendant 1h. Les cultures ont été immunocolorées pour les trois types de cellules d'intérêt : neurones : anti- β III-tubuline (rouge), astrocytes : anti-GFAP (vert), microglie : anti-Iba1 (orange) ; les noyaux ont été colorés via le DAPI (bleu). Barre d'échelle = 100 μ M. (B) Comparaison de la surface moyenne des astrocytes entre les co- et tri-cultures après des défis avec différentes concentrations de glutamate. (C) Pourcentage de couverture de surface des neurones après un challenge excitotoxique (D) Surface moyenne de la microglie n'a pas changé après un traitement avec différentes concentrations de glutamate. (E) Imagerie calcique montrant le changement d'intensité de fluorescence suite à un traitement avec différentes concentrations de glutamate. $n=3$; une lettre différente indique une différence significative avec une p -value $p < 0,05$ (Goshi et al., 2020).

Matériel & Méthodes

I) Culture cellulaire

Au cours de la réalisation de mes travaux de thèse, j'ai utilisé deux modèles de cultures primaires de NSCs. La première en monocouche cellulaire (2D). La seconde culture en culture d'organoïdes (3D).

1. Modèle murin

Les cultures primaires ont été faites à partir de souris de fond génétique C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France) ont été hébergées dans un environnement à température et humidité contrôlées selon un cycle lumière/obscurité de 12 h avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Les soins et l'expérimentation des animaux étaient conformes à la directive du Conseil des Communautés européennes (2010/63/UE) et au ministère français saisine APAFIS # 21860.

2. Préparation à la mise en culture : dissection

La culture primaire de NSCs est obtenue à partir de souriceaux, âgés de 1 à 5 jours. A cet âge, le cerveau contient un pool conséquent de NSCs. Ces cellules multipotentes ont une forte capacité de différenciation (cellules neuronales et gliales) et possèdent une croissance rapide. Chaque culture est réalisée à partir d'une portée. Les souriceaux sont de sexe différent, pour se prémunir des différences cellulaires liées au sexe. Par microdissection, les bulbes olfactifs, le cervelet et l'hippocampe ont été retirés et les méninges ont été éliminées (Figure 43). Ainsi, les cellules souches récoltées proviennent principalement de la SVZ. Le télencéphale disséqué a été dissocié mécaniquement avant digestion enzymatique avec de la papaïne (Sigma, P4792). Les cellules ont ensuite suspendues dans du milieu DMEM (Sigma, D5671), complété avec 10 % de sérum bovin fœtal (FBS, GE Healthcare HyClone), 1 000 unités/mL de pénicilline-streptomycine (GIBCO 15070-063) et 2 mM de L-Glutamine (GIBCO, 25030-024). Les cellules ont été étalées sur des flacons de 25 cm² pré-enduits de poly-L-lysine (5 µg/mL, BD Biosciences). Les NSCs sont maintenues en culture à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans un incubateur humidifié jusqu'à confluence. Pour éviter la toxicité des débris cellulaires, le milieu a été remplacé le lendemain de la mise en culture, puis tous les deux jours, par le milieu contenant le facteur de croissance épidermique (EGF, 30 ng/mL Sigma E9644) pour maintenir les cellules dans un état indifférencié.

Lorsque les cellules atteignent la confluence, généralement 7 jours après l'ensemencement, elles ont été détachées avec de la trypsine (Sigma, 59417C). Selon le modèle de culture utilisé, 2D ou 3D, le support et le nombre de cellules qui y sont ensemencées différent. Un schéma illustre les différences et similarités entre ces deux types de culture (Figure 43).

Pour une culture neurosphères, des plaques *ultra low attachment* ont été utilisées (Corning, 7007). Ces plaques ont permis une auto-aggrégation des cellules entre elles et à terme une auto-organisation. A chaque changement de milieu, la moitié du milieu cellulaire a été retiré, les plaques sont soumises à

une agitation mécanique (100 – 150rpm) pendant 10 à 15 minutes, puis 100µL de milieu frais ont été ajouté.

3. Traitement

Dans ces modèles d'exposition *in vitro*, l'intérêt est porté sur l'effet des polluants sur la différenciation cellulaire. Un traitement chronique aux molécules seules, ou en mélange pendant une semaine a été effectué. Les toxiques sont ajoutés au même moment que le renouvellement de milieu de culture, c'est-à-dire tous les deux jours pendant une semaine. Le choix des concentrations d'études des polluants se base sur la littérature ainsi que sur des tests de viabilité et de cytotoxicité réalisés. Ainsi, les effets du glyphosate sont étudiés à 30µM, ceux du glufosinate d'ammonium à 3µM (200) et ceux de la BMAA à 100µM (17).

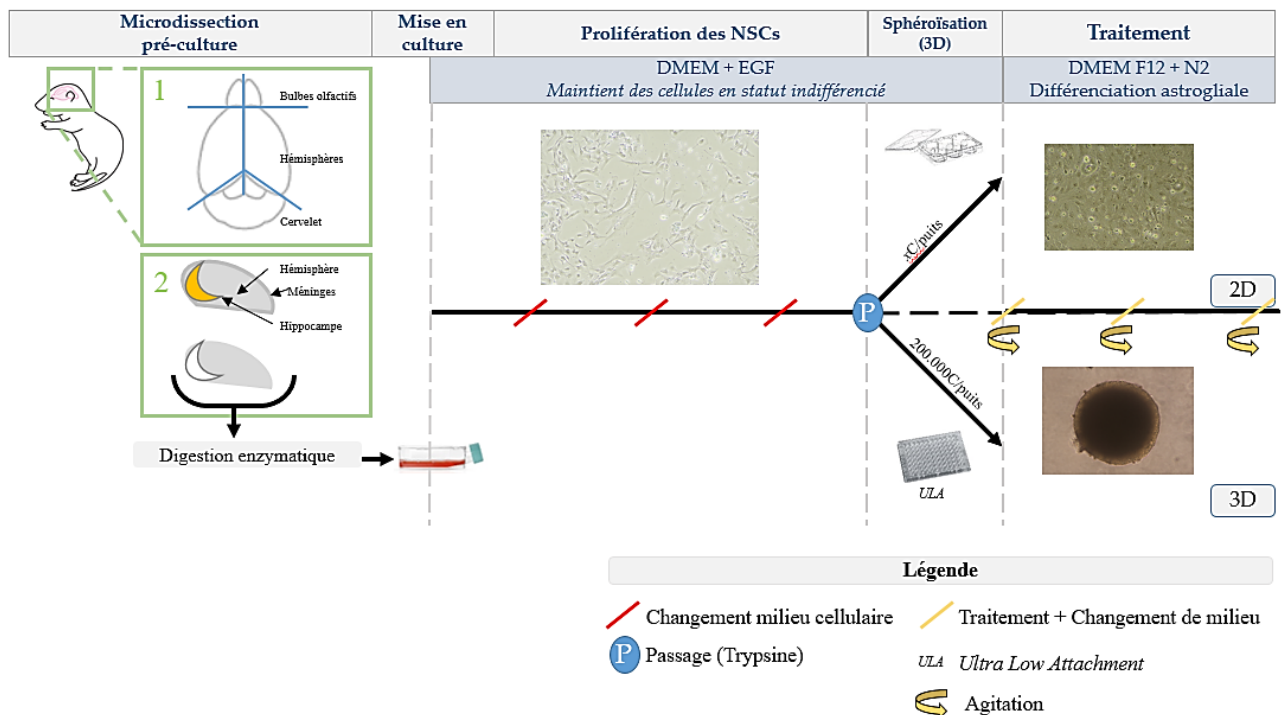


Figure 43 : Représentation des différentes phases de culture pour les modèle 2D et 3D.

II) MTT

Principe

La viabilité cellulaire a été mesurée par le dosage du bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-yl)2,2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT, Sigma, M2003). Ce test est basé sur la conversion du sel de tétrazolium en produit coloré formazan par la succinate déshydrogénase qui est une enzyme mitochondriale. Seules les cellules

métaboliquement actives vont être en mesure de former des cristaux de formazan. L'intensité de la coloration est ainsi proportionnelle à la quantité de cellules viables.

Protocole

Concernant les cellules en deux dimensions, les NSCs ont étéensemencées à 4×10^4 cellules par puits dans des plaques à 96 puits. A la fin de l'exposition, le MTT a été ajouté au milieu (5 mg/mL) et incubé pendant trois heures. Le produit formazan généré a été solubilisé dans du diméthylsulfoxyde pendant 15 minutes. Concernant les neurosphères, le protocole utilisé fut adapté à partir de Bresciani et al. (318). Le MTT est ajouté au milieu (5mg/mL) puis incubé à 37°C sur la nuit. Ainsi, les cristaux de formazan se forment jusqu'au cœur de la sphère. Les cristaux de formazan sont solubilisés après ajout de DMSO en effectuant des allers-retours à l'aide de la pipette multicanale. Lorsque les puits sont homogènes, l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (ClarioStar, BMG LABTECH).

III) LDH-Glo

Principe

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique soluble et stable présente dans de nombreux types de cellules. Elle est rapidement libérée dans le milieu de culture cellulaire lors de la rupture de la membrane plasmique. Sa présence dans le milieu reflète donc la cytotoxicité.

Protocole

La libération de LDH a été mesurée à l'aide du test de cytotoxicité LDH-Glo™ (Promega, J2380) selon le protocole du fabricant. Brièvement, 5 µl de milieu surnageant ont été collectés à partir de chaque échantillon après 48h, 96h et une semaine de traitement et stockés à -20°C dans le tampon de stockage. Les niveaux de LDH sont mesurés en ajoutant un volume égal de réactif de détection de LDH à l'échantillon dilué. La luminescence a été enregistrée après 40 minutes à l'aide d'un lecteur de microplaques (ClarioStar, BMG LABTECH).

IV) Immunocytochimie

Principe

L'immunocytochimie (ICC) permet de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines antigènes cellulaires, qu'ils soient extracellulaires ou intracellulaires. Cette technique est basée sur la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps qui forme un complexe, rendu visible et localisable par un fluorochrome. J'ai utilisé la technique des immunomarquages indirects, c'est-à-dire que l'antigène a été

reconnu par un anticorps primaire qui est lui-même reconnu par un anticorps secondaire conjugué au fluorochrome.

Protocole

Les NSCs ont étéensemencées à 1×10^5 cellules par puits dans des plaques à 24 puits contenant des lamelles de verre pré-coatées à la Poly-L-Lysine (PLL, Sigma, P1524) pour permettre leur adhésion. Pour l'étude de la migration des cellules à partir de neurosphères, les organoïdes ont été déposés sur Matrigel (BD Biosciences 356237, Heidelberg, Germany) mimant une matrice extra-cellulaire. Les cellules d'intérêt ont ainsi quitté la structure en trois dimensions et ont migré en deux-dimensions.

Suite au protocole d'exposition, le milieu a été retiré et les lamelles ont été lavées avec du Tris-Buffer Saline 1X (TBS, pH 7,6, Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM). Selon la localisation des protéines, le temps de fixation au paraformaldéhyde (PFA) 4°C diffère. Pour les protéines intracellulaires il est de 10 minutes. Pour les protéines extracellulaires, il est de 1 minute. Le PFA a été lavé avec du TBS. Les cellules ont été perméabilisées et saturées avec du TBS contenant 10 % de FBS ; 0,2% Triton X-100 (Euromedex, réf 2000-A) et 2% de Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, A9418) pendant 30 minutes à température ambiante. Les lamelles ont été incubées au moins trois heures à température ambiante en utilisant les anticorps appropriés (cf Table 10) puis rincées avec du TBS et incubées avec des anticorps secondaires appropriés (1:500, anti-lapin, anti-souris ou anti-chèvre Alexa 488 ou conjugué au TRITC) pendant 45 minutes, également à température ambiante dans une solution de TBS avec une solution de FBS à 10 %. et 2 % de BSA. Après rinçage, les lamelles ont été incubées deux minutes avec du DAPI, pour visualiser les noyaux cellulaires. Les lamelles ont été rincées trois fois dans du TBS et une fois dans de l'eau distillée avant d'être montées sur des lames de verre avec du milieu de montage Fluoromount-G (Clinisciences K024-200). Les images microscopiques ont été obtenues à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM6000B avec le logiciel Metamorph avec un grossissement de 20x ou immergé de 100x. Pour chaque condition, au moins deux expériences indépendantes ont été étudiées. Pour chaque point expérimental, au moins trois champs ont été quantifiés par lamelle, puis moyennés. Les distances et les dimensions ont été mesurées à l'aide du logiciel Image J® (NIH Image).

	Antigène	Dilution	Marquage	Référence
Anti-	Ki-67	1/150	Prolifération cellulaire	ab15580
	Nestin	1/500	Cellules B1 et cellules C	ab11306
	GFAP	1/500	Cellules B1 et astrocytes	Dako
	Doublecortin	1/250	Cellules A (neuroblastes)	ab77450
	Olig2	1/500	Précurseurs d'oligodendrocytes (OPC) ; certains astrocytes	AB9610

Table 10 : Anticorps primaires utilisés en immunocytochimie (ICC)

V) Transparisation et microscopie confocale

Afin de pénétrer à travers toutes les couches des neurosphères par microscopie confocale, les neurosphères ont été fixées avec 4% de PFA pendant 10 min et préparées selon le protocole MILTENYI Biotec en utilisant le kit de transparisation (MACS[®] Clearing Kit, 130-126-719). Pour marquer les neurosphères ont été incubées avec les anticorps primaires ciblant la doublecortine (anti-DCX, 1:250), GFAP (anti-GFAP, 1:250), nestin (anti-nestin, 1:200), Iba-1 (anti-Iba-1, 1:100) à 37 °C pendant 18 h, lavées trois fois avec une solution de coloration d'anticorps 1X pendant 25 min. Ensuite, les neurosphères ont été incubées pendant 1h30 avec les anticorps secondaires adaptés (1 :500) et lavées deux fois avec la solution de marquage dépourvue d'anticorps. Les noyaux des cellules constituant les neurosphères ont été marqués avec du DAPI pendant 5 min puis lavées une nouvelle fois. Les neurosphères immunocolorées ont été positionnées dans la lamelle à 8 puits Nunc[™] Lab-Tek[™] (ThermoFischer Scientific, 155411) et les images de la couche Z-stack obtenues sur le microscope confocal Zeiss LSM980 avec AiryScan 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Allemagne). L'analyse des images a été réalisée dans le logiciel ZenBlue.

VI) Cytométrie en flux

Principe

La cytométrie en flux permet de caractériser de façon individuelle, quantitative et qualitative, de particules en suspension dans un liquide. Les particules sont nommées « évènements ». Les évènements d'intérêt sont principalement les cellules que l'on souhaite analyser. Ainsi, les particules sont aspirées puis analysées via un ou plusieurs faisceaux lumineux. Le cytomètre permet de classer les cellules selon des critères physiques tels que leur taille (FSC) leur granulosité (SSC) et aussi selon l'expression de marqueurs désirés.

Protocole

Les populations cellulaires, la différenciation et l'état neuroinflammatoire ont été évalués par cytométrie en flux. Concernant les cellules en deux dimensions, les NSCs ont étéensemencées à 1×10^5 cellules par puits dans des plaques à 6 puits. Concernant les cellules en 3D, les neurosphères, celles-ci ont été regroupées par huit puis les cellules les constituant ont été dissociées et individualisées en suivant les instructions du Kit fourni par Miltenyi (Neurosphere Dissociation Kit, 130-095-943).

Après une semaine d'exposition, les cellules ont été colorées avec des anticorps marqueurs fluorescents : Fixable Viability Dye (eBiosciences[™], 65-0865-14, 1/800), anti-ACSA2 APC (MILTENYI, 130-117-386,

1:50), anti-CD45 V450 (BD Horizon™, 560501, 1:100), anti-CD11b PerCP/Cy5 (BD Pharmingen™, 560993, 1:100), anti-CD86 FITC (BD Biosciences, 561961, 1:100), anti-CD206 PE-Cy7 (BioLegend, 141720, 1:100). Un anticorps anti-CD16/32 non conjugué (BD Pharmingen™, 553142, 1:100) a été utilisé pour bloquer les récepteurs Fc non spécifiques pendant 20min à 4°C. Ensuite, les cellules ont été lavées et avant la fixation, la population de cellules souches neurales a été colorée avec Nestin PE intracellulaire (MILTENYI, 130-119-799, 1:50) après perméabilisation cellulaire pendant 20min à 4°C avec Cytotfix/Cytoperm Plus Kit (BD Biosciences, Paris, France). Seules les cellules en monocouche ont été marquées de façon intracellulaires. Les cellules ont ensuite été lavées et remises en suspension dans une solution de lyse (BD FACSTM Lysing Solution) avant l'acquisition. Les données ont été acquises avec un cytomètre en flux (BD FACSCanto II) et analysées avec le logiciel FlowJo v10 (Tree Star, Ashland, OR). Les faibles SSC et FSC ont été exclus pour éliminer les débris cellulaires de l'analyse et définir strictement les populations d'intérêt. Ensuite, les cellules vivantes individuelles ont été sélectionnées. Le statut d'activation a été défini à l'aide du rapport CD86/CD206 obtenu après coloration avec un anticorps anti-CD86 pour le statut pro-inflammatoire et un anticorps anti-CD206 pour le statut anti-inflammatoire.

VII) RT-qPCR

Principe

La RT-qPCR, ou réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel, repose sur la détection et la quantification directe au cours du temps de la fluorescence émise par les produits nucléiques nouvellement formés, amplifiés. L'augmentation du signal est ainsi proportionnelle à la quantité d'amplicons générés depuis le début de la réaction. L'émission de fluorescence au cours du temps est divisée en trois phases : la phase de bruit de fond (*baseline*), la phase exponentielle (amplification des amplicons à chaque cycle) et la phase plateau. Lorsque le signal fluorescent est différenciable du bruit de fond, on parle d'un cycle seuil Ct (*cycle threshold*). Il correspond au début de la phase exponentielle d'amplification et est corrélé au nombre de copies initiales d'ADN cible. Ainsi, plus le signal est détecté tôt en terme de cycle, plus cela signifie que l'expression génique est importante.

Protocole

L'expression des gènes d'intérêt ont été évalués par RT-qPCR. Concernant les cellules en deux dimensions, les NSCs ont été ensemencées à 1×10^5 cellules par puits dans des plaques à 6 puits. Pour les neurosphères, celles-ci ont été rassemblées par 8 avant d'en extraire l'ARN.

Pour quantifier l'expression génique plusieurs étapes sont indispensables. La première consiste à extraire l'ARN des cellules, la deuxième consiste à synthétiser les ADNc à partir de l'ARN quantifié et la dernière est la qPCR en tant que tel.

- *Extraction d'ARN*

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide de trizol (TRI-reagent, Sigma, T9424). Sur chaque culot de cellule, 300µL de trizol ont été ajoutés. Après homogénéisation, les tubes sont laissés 5min à température ambiante puis ils sont centrifugés à 12 000G, 4°C pendant 10 minutes. Les surnageants sont ensuite récoltés et transférés dans un nouvel eppendorf. 30µL de 1-bromo-3-chloropropane (BCP) sont ajoutés dans chaque échantillon puis incubés 15 min à température ambiante. Ensuite, une centrifugation a été effectuée (12 000G, 15 minutes, 4°C). La phase aqueuse, qui contient les acides nucléiques, fut récupérée puis 150µL d'isopropanol ont été ajoutés ainsi que 1µL de glycogène (ThermoFisher R0561) permettant la précipitation des acides nucléiques. Sa non solubilité à l'éthanol permet de mieux visualiser le culot. Les échantillons sont laissés à température ambiante pendant 10min, puis centrifugés (12000G, 8 minutes, 4°C). Le surnageant a été ensuite éliminé, et le culot a été lavé à deux reprises à l'aide de 300µL d'éthanol 75%. Après élimination méticuleuse de l'éthanol, les culots sont mis à sécher (3-5 minutes) puis remis en suspension dans 10µL d'eau RNase free.

La concentration en ARN total a été mesurée via le spectromètre Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific) et du logiciel associé. Le spectre d'absorption est effectué à 230nm (λ des contaminants), à 260nm (λ de l'ADN) ainsi qu'à 280 (λ des protéines). La pureté de l'échantillon a été évaluée par le rapport DO_{260}/DO_{280} qui doit être supérieure à 1,8 et la contamination fut elle évaluée par le rapport DO_{230}/DO_{280} . Ensuite, l'intégrité fut vérifiée en déposant un minimum de 600ng d'ARN sur un gel d'agarose à 1.5% contenant du BET qui est un intercalant des acides nucléiques.

- *Synthèse de l'ADNc*

La transcription inverse (Reverse Transcription, RT) permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARNm. Pour cela, on utilise la Reverse Transcriptase, l'enzyme permettant cette réaction reverse, présente dans le kit Promega (A5001). 500ng d'ARN totaux de chaque échantillon sont utilisés. Le mélange réactionnel contient des primers aléatoires (dNTPs), des oligo(dT) capables de s'hybrider notamment aux amorces permettant la synthèse de l'ADNc.

- *qPCR*

Les RT-PCR ont été réalisées à l'aide kit Promega (A6002). Et du thermocycleur Aria Mx (Stratagene MX3005P, Agilent Technologies). Les primers utilisés proviennent de chez Qiagen (Table 10). Leur expression est donnée en expression relative par rapport au gène de ménage *18S*. L'analyse est réalisée grâce au logiciel Agilent Aria 1.5. Pour chaque expérience des triplicats biologiques et techniques ont été réalisés.

Nom du gène	Primer	Référence (Qiagen)
<i>18S</i>	Mm_Rn18S_3_SG	QT02448075
<i>B-actine</i>	Mm_Actb_1_SG	QT00095242
<i>Hprt</i>	Mm-Hprt_1_SG	QT00166768
<i>GFAP</i>	Mm_Gfap_1_SG	QT00101143
<i>Nestin</i>	Mm_Nes_1_SG	QT00316799
<i>Itgam</i>	Mm_Itgam_1_SG	QT00156471
<i>Tmem119</i>	Mm_Tmem119_1_SG	QT00256025
<i>NF-κB</i>	Mm_Nfkb_1_SG	QT00154091
<i>STAT3</i>	Mm_Stat3_1_SG	QT00148750
<i>IL-6</i>	Mm_Il6_1_SG	QT00098875

Table 10 : Liste des gènes utilisés en RT-qPCR.

VIII) Analyse protéomique

Pour identifier les voies de signalisation susceptibles d'être impliquées dans les processus inflammatoires et/ou de différenciation cellulaires, des cultures de NSCs ont été traitées pendant 15 minutes avec 100µM de BMAA dans un milieu de différenciation. Les protéines ont été extraites avec du tampon RIPA (Thermo-Fisher, 89901) additionné d'un cocktail inhibiteur anti-protéases et anti-phosphatases (Thermo-Fisher, 78442). La concentration protéique a été déterminée dans le surnageant par le kit de dosage des protéines BCA (Thermo-Fisher 71285-3). L'analyse du protéome a été analysée et traitée avec le kit Phospho-kinase Array (R&D, #ARY003C). Il s'agit d'un outil rapide et sensible pour détecter simultanément les niveaux relatifs de phosphorylation de 37 sites de phosphorylation de kinase et de 2 protéines totales apparentées. Cet outil permet un screening rapide sans effectuer de Western blots.

Birèvement, les lysats cellulaires ont été incubés sous agitation pendant une nuit à 2-8°C sur les membranes de nitro-cellulose. Les membranes ont été lavées pour éliminer les protéines non liées, suivies d'une incubation avec un cocktail d'anticorps de détection biotinylés pendant deux heures à température ambiante toujours sous agitation. Des réactifs de détection streptavidine-HRP et chimioluminescents ont été appliqués et un signal a été produit à chaque point de capture

correspondant à la quantité de protéine phosphorylée liée. Le chimiluminescent a été lu en utilisant les systèmes d'imagerie ChemiDoc™ (BIO-RAD). Les dot blots ont été quantifiés avec le logiciel ImageJ.

9. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM pour chaque groupe expérimental. Chaque point correspond à un réplicat biologique. Nos données n'ayant pas suivi une distribution normale, les différences par rapport au témoin ont été analysées par des tests de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis selon le nombre de groupe, en tant que données non paramétriques. L'ANOVA two-way a été utilisée lorsque nécessaire. L'ensemble des tests a été effectué en utilisant GraphPad Prism 9® (San Diego, Californie, États-Unis). Les valeurs $p \leq 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

Etude n°1. Etude de l'effet de la toxine BMAA sur des populations de cellules issues de la niche neurogénique SVZ et investigation de son potentiel neuro-inflammatoire

En utilisant des modèles *in vitro* en 2D et 3D des cellules souches issues de la SVZ nous avons cherché à savoir si la BMAA perturbait la neurogenèse secondaire et les phénomènes neuro-inflammatoires. Une partie de ces résultats ont fait l'objet d'une publication au sein de la revue *Toxicology*.

A. Contexte de l'étude

L'implication de polluants environnementaux dans le développement de pathologies du système nerveux est proposée depuis plusieurs années. La cyanotoxine β -N-Méthyl-Amino-L-Alanine (BMAA) est un acide aminé non protéique produit par deux groupes distincts de microalgues, les diatomées et les dinoflagellés (64), ainsi que par plus de 95 % de toutes les espèces de cyanobactéries (29). Elle est soupçonnée d'être à l'origine de troubles et est de plus en plus considérée comme un facteur de risque environnemental potentiel pour l'apparition de maladies neurodégénératives sporadiques, telles que la maladie d'Alzheimer (MA), la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et le complexe sclérose latérale amyotrophique/parkinsonisme-démence (SLA/PDC) (125).

Les cyanobactéries sont présentes dans le monde entier, en particulier dans les milieux aquatiques. Le réchauffement climatique et l'eutrophisation contribuent tous deux à l'augmentation de la prolifération des algues et, par conséquent, à la présence de BMAA (24). La BMAA représente donc un problème de santé publique à l'échelle mondiale en raison de l'exposition chronique des humains et d'autres espèces. Les eaux de loisirs et les fruits de mer sont les principales sources de contamination (61). En effet, cette toxine a été détectée en particulier dans les bivalves et les poissons filtreurs (61,319). La BMAA a la particularité d'être capable de se bioaccumuler le long de la chaîne trophique (135), ce qui conduit à des quantités élevées chez les prédateurs au sommet de la chaîne. Récemment, des études sur l'environnement marin ont montré des niveaux élevés de BMAA chez les requins et les dauphins, avec chez ses derniers des altérations neurodégénératives (320,321). De façon préoccupante, la BMAA a également été mesurée dans le système nerveux central humain (125,128). Les données actuelles suggèrent que les maladies neurodégénératives, outre leurs origines multifactorielles et complexes prendraient aussi leur racine tôt dans la période de développement (322). En effet, le processus de développement neurologique est une période critique et particulièrement sensible à l'exposition aux substances toxiques. Une perturbation au cours de cette période peut donc altérer le développement des structures neuronales et/ou entraîner des conséquences néfastes à court et à long terme (323,324).

Les cellules souches neurales (NSCs) sont un modèle *in vitro* utile pour étudier les mécanismes de la neurotoxicologie développementale (325). En effet, les NSCs ont le potentiel de se différencier en neurones, oligodendrocytes, astrocytes et de s'auto-renouveler suffisamment pour générer le SNC à partir d'un nombre réduit de NSCs (238,326). Récemment, Pierozan et al. ont montré que les cellules souches neurales de l'hippocampe sont plus sensibles à la BMAA que les neurones primaires (17). Ils ont démontré que la BMAA induisait l'apoptose dans les NSCs à 50 μ M, soit à une dose douze fois inférieure à celle nécessaire pour diminuer la viabilité des cultures de neurones primaires (3mM). En outre, une faible concentration de BMAA a inhibé la différenciation des cellules souches neurales en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Cependant, si certaines études ont mis en évidence les effets neurotoxiques potentiels de la BMAA sur ces cellules du développement neurologique (102,124), l'effet de la BMAA sur la fonction neuroinflammatoire reste à caractériser. Dans ce contexte, les cellules microgliales sont particulièrement importantes à considérer. En effet, il a été démontré que la microglie a des rôles cruciaux et distincts au cours du développement, notamment en régulant la différenciation cellulaire et la neurogenèse. La microglie phagocyte plusieurs produits cellulaires provenant de cellules mortes, mourantes et vivantes et sécrète un ensemble de cytokines telles que l'IL-1 β et TNF α modulant les événements neurodéveloppementaux (267,268).

Dans la présente étude, nous avons étudié l'impact d'une exposition chronique à une faible concentration de BMAA, conformément à la littérature, pendant la différenciation cellulaire des cultures primaires de NSCs provenant de SVZ. Une partie de l'étude est réalisée sur modèle 2D tandis que l'autre se réalise sur culture d'organoïde en trois dimensions, les neurosphères. Ces deux modèles ont l'avantage de prendre en considération les interactions des NSCs avec les cellules microgliales, présentes dans nos cultures. Ainsi, après avoir évalué la cytotoxicité et la viabilité potentiellement perturbées par la BMAA, nous avons caractérisé la population cellulaire après une semaine de différenciation. Compte-tenu du rôle de la SVZ dans la synthèse de nouveaux neurones immatures, les neuroblastes, nous nous sommes également intéressés à cette population sur modèle 2D ainsi que sur notre modèle 3D, les neurosphères. Ensuite, afin d'élucider si la BMAA induit une neuro-inflammation, nous avons étudié l'état d'activation des cellules immunocompétentes, des astrocytes et des cellules microgliales, les changements morphologiques des cellules microgliales et la libération de cytokines pro-inflammatoires induites par la BMAA.

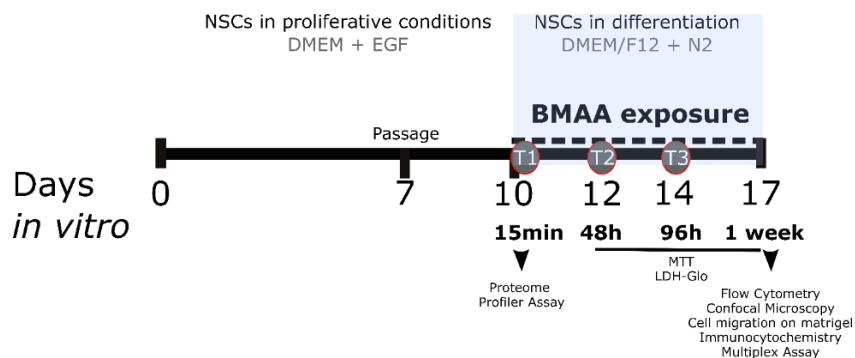


Figure 44 : Représentation du protocole expérimental pour l'évaluation des effets de la BMAA sur les NSCs. Des NSCs primaires murines *in vitro* ont été isolées à partir de la SVZ au jour 0. Après 7 jours dans des conditions prolifératives, les cellules ont été trypsiniées puis soit ensemencées dans des plaques 96 puits ULA pour permettre une organisation en neurosphère, ou ensemencées dans des plaques classiques pour une évaluation toxicologique en 2D, dans le même milieu. Les cellules ont ensuite été traitées tous les deux jours avec de la BMAA de façon concomitante avec le changement de milieu, à différentes concentrations (100µM, 300µM et 3mM) pendant que la différenciation se produit. 48h, 96h et une semaine après le premier traitement, la viabilité et la cytotoxicité ont été évaluées par des tests MTT et LDH-Glo. Après une semaine de traitement, correspondant à un total de trois traitements, les populations cellulaires et le statut d'activation ont été définis par cytométrie de flux ; l'organisation des neurosphères a été définie. Au même moment, la prolifération des cellules indifférenciées, la population et la migration des neuroblastes et la morphologie des cellules microgliales ont été évalués par immunocytochimie. La libération de cytokines pro-inflammatoires a été mesurée par dosage multiplex.

B. Résultats

a) Effets limités de l'exposition à la BMAA sur la toxicité et la viabilité des cellules

Nous avons cherché à déterminer si la BMAA induisait une cytotoxicité ou perturbait la viabilité à des concentrations de 100µM, 300µM et 3mM dans les cellules souches neurales. Ceci a été évalué après 48h, 96h et une semaine de traitement pendant la différenciation en cellules neurogliales selon notre plan expérimental (Figure 44). Les concentrations de BMAA les plus élevées, 3mM, ont induit une cytotoxicité après 48h de traitement à 3mM par rapport aux concentrations plus faibles. Cet effet était transitoire ou inversé après 96 h ou une semaine de traitement. Cela peut témoigner d'une potentielle « résilience » des cellules. Après une semaine de traitement, il semble y avoir moins de libération de LDH dans le milieu, et donc de cytotoxicité (non significatif) (Figure 45). Quel que soit le temps d'exposition, l'exposition à la BMAA n'a pas affecté la viabilité (Figure 45). La plus forte concentration de BMAA étudiée dépourvue de toxicité cellulaire était de 300µM. La concentration de 100µM a été choisie pour analyser plus en détail les effets de la BMAA sur la différenciation cellulaire, les populations cellulaires et les processus neuroinflammatoires. Cette concentration est considérée comme faible dans la littérature.

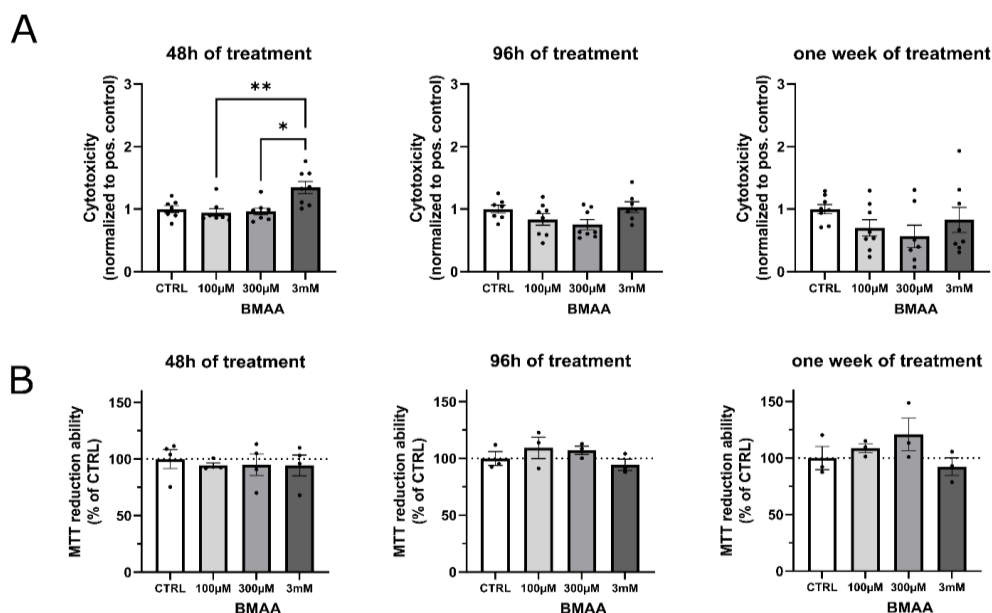


Figure 45 : Effets de la BMAA sur la toxicité et la viabilité de cellules souches neurales (NSCs) et différenciées. La toxicité cellulaire a été déterminée à l'aide du test LDH-Glo après traitement avec 100µM à 3mM de BMAA pendant 48h, 96h et une semaine pendant la différenciation ; 10% de Triton X-100 a été utilisé comme contrôle positif. Pour 48h de traitement CTRL n = 7 ; BMAA 100µM n = 7 ; 300µM n = 7 ; 3mM n = 8. 96h de traitement CTRL n = 7 ; BMAA 100µM n = 8 ; 300µM n = 8 ; 3mM n = 7. Une semaine de traitement CTRL n = 8 ; BMAA 100µM n = 8 ; 300µM n = 7 ; 3mM n=7 (A). La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT après traitement avec 100µM à 3mM de BMAA pendant 48h, 96h et une semaine pendant la différenciation. Pour 48h de traitement CTRL n = 4 ; BMAA 100µM n = 3 ; 300µM n = 4 ; 3mM n=4. 96h de traitement CTRL n = 3 ; BMAA 100µM n = 3 ; 300µM n = 3 ; 3mM n = 3. Une semaine de traitement CTRL n = 3 ; BMAA 100µM n = 3 ; 300µM n = 3 ; 3mM n=3 (B). Les valeurs sont normalisées et représentent la moyenne ± SEM. Les différences statistiques sont indiquées : *p < 0,05, **p < 0,01 en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

b) Effets de la BMAA sur les neurosphères et leur organisation

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer si la BMAA, à 100µM, modifiait le nombre de cellules au sein des neurosphères. Pour cela, avant chaque traitement et après le dernier, les neurosphères ont été prises en photos et leur taille ont été mesurées par ImageJ. Avant le premier traitement, les tailles des sphères étaient uniformes (jour 1). La différence de taille entre les organoïdes cérébraux traités et ceux contrôles se creuse au cours du temps. La différence significative dans la taille des neurosphères observée le dernier jour (un jour après le dernier traitement) est illustrée sur le graphique chronologique (Figure 46). La mesure de la viabilité cellulaire des neurosphères traitées avec 100µM de BMAA pendant une semaine a été mesurée par MTT. En comparaison à la condition contrôle, les résultats révèlent une viabilité cellulaire plus faible suite au traitement chronique, indiquant des potentiels phénomènes apoptotiques ou bien une prolifération cellulaire moindre (Figure 46). Fait intéressant, le test LDH-Glo a montré une tendance à une toxicité plus importante au sein de la condition BMAA par rapport au contrôle mais sans différence significative (Figure 46). De façon non quantitative mais qualitative, nous nous sommes intéressés à l'organisation des types cellulaires au sein des neurosphères suite à l'exposition à 100µM BMAA pendant une semaine. Les images, prises au

microscope confocal, ne semblent pas mettre en avant une différence d'organisation. Cependant le nombre de réplicat biologique soit à augmenter.

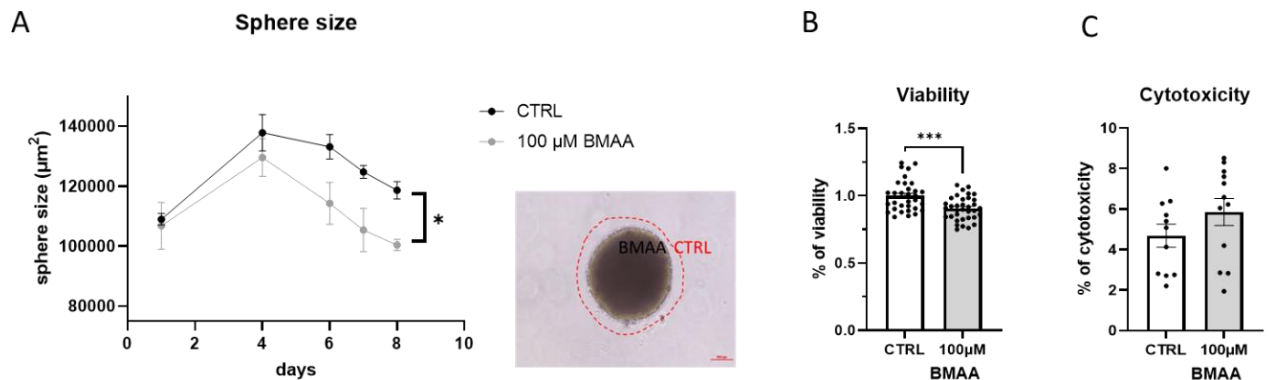


Figure 46 : Effets de la BMAA sur modèle in vitro d'organoïde cérébral. La taille des sphères a été mesurée via Image J suite à la prise de photo à l'aide du microscope Nikon à contraste de phase avant et pendant le traitement à 100µM de BMAA pendant 48h, 96h et une semaine pendant la différenciation ; CTRL n = 8 ; BMAA n = 8 (A). La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT après traitement avec 100µM après une semaine de traitement ; CTRL n = 33 ; BMAA n = 35 (B). La cytotoxicité a été déterminée à l'aide du test LDH-Glo après traitement avec 100µM après une semaine de traitement ; CTRL n =11 ; BMAA n = 12. Les valeurs sont normalisées et représentent la moyenne ± SEM. Les différences statistiques sont indiquées : *p < 0,05, ***p < 0,01 en utilisant le test de Mann-Whitney.

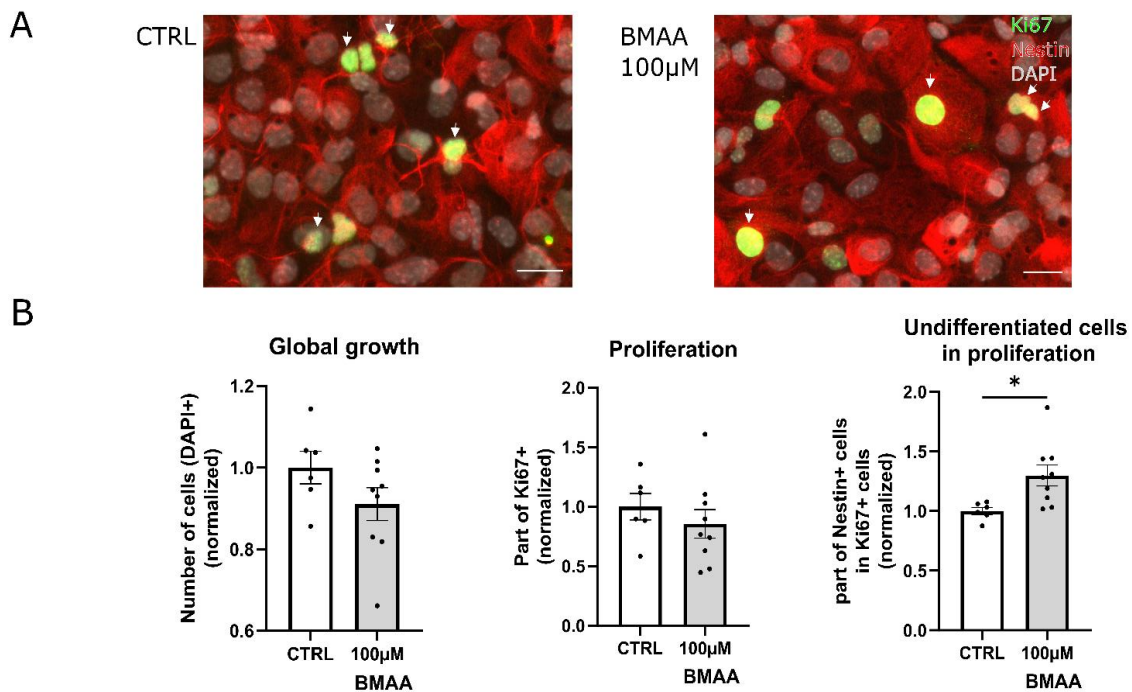
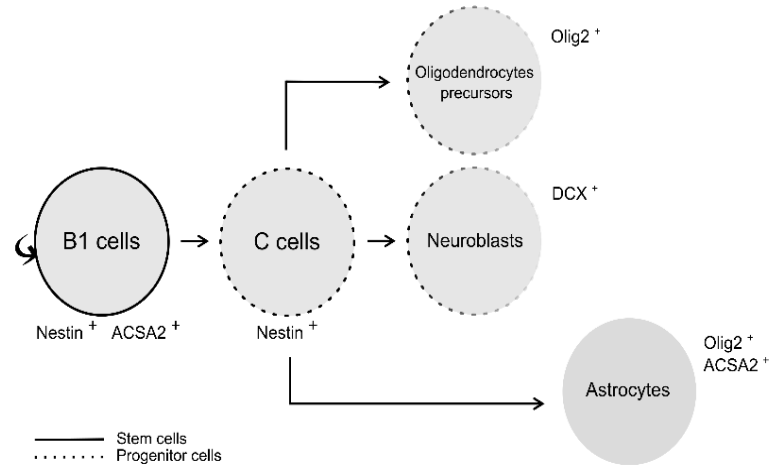


Figure 47 : Prolifération des cellules souches après exposition à la BMAA dans une culture de cellules souches neurales (NSCs). La prolifération des cellules a été déterminée par immunocytochimie avec la coloration de la Nestin pour discriminer les cellules indifférenciées et la Ki67 pour les cellules prolifératives ; Barre d'échelle = 20µm (A). Quantification du nombre total de cellules par champ, de la proportion de cellules en capacité de proliférer et de la proportion de cellules positives à la Nestin dans les populations de cellules prolifératives après traitement à la BMAA (100µM) par rapport aux contrôles non traités (B). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM, normalisée (CTRL n = 6 ; BMAA 100µM n=9). Les différences statistiques par rapport au contrôle sont indiquées : * p < 0,05 en utilisant le test de Mann-Whitney.

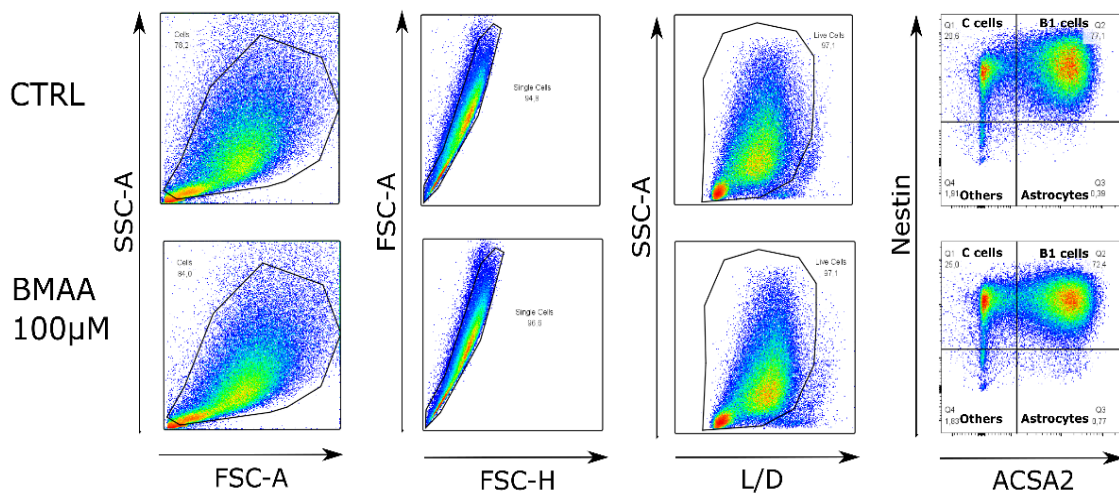
c) L'exposition à la BMAA favorise la capacité de prolifération des cellules souches neurales et entrave la différenciation des cellules indifférenciées.

L'effet de la BMAA sur la prolifération des cellules indifférenciées a été étudié par immunocytochimie en utilisant Ki67 comme marqueur de la prolifération et du maintien de la capacité de prolifération. Pour distinguer les cellules souches neurales, une coloration de la protéine Nestin a été réalisée. Une attention particulière a été accordée aux cellules doublement marquées (Figure 47). La croissance basée sur le nombre total de cellules n'a pas été affectée par 100 μ M de BMAA à la fin des phases de différenciation. De plus, il n'y a pas eu de modification de la proportion de cellules en prolifération dans la culture cellulaire. Ainsi, la BMAA n'a affecté ni la croissance ni la prolifération des cellules dans ces conditions. Il est intéressant de noter que la proportion de cellules neurales indifférenciées Nestin+ en capacité de prolifération était significativement plus élevée après traitement à la BMAA. Cela suggère un déséquilibre dans la population de cellules indifférenciées qui sont des cellules B1 et des cellules C (Figure 48). Nous avons ensuite caractérisé la population de cellules indifférenciées en détail par cytométrie de flux. Pour plus de clarté sur les marquages cellulaires employés, un schéma des marquages spécifiques utilisés pour discriminer chaque population cellulaire est présenté (Figure 48). Ici, les cellules B1 ont été doublement marquées par l'anticorps dirigé contre la protéine Nestin et ACSA2 (astrocyte cell surface antigen-2). Bien qu'initialement développé pour identifier les astrocytes, ce marquage montre également les cellules B1 (239). Les cellules C n'étaient colorées que par la Nestin et les astrocytes n'étaient colorés que par ACSA2. L'exposition à la BMAA a conduit à une diminution faible mais significative de la population de cellules B1, en corrélation avec une tendance à l'augmentation des populations de cellules C (Figure 48). Nous n'avons pas observé de changements dans les populations d'astrocytes. Au sein des organoïdes cérébraux nous pouvons identifier une répartition cellulaire distincte selon les types cellulaires (Figure 49) ; en effet les astrocytes semblent être présents majoritairement en périphérie ainsi qu'au cœur de la neurosphère tandis que les cellules souches neurales semblent être présentes de façon homogène à l'intérieur de la neurosphère (Figure 49).

A



B



C

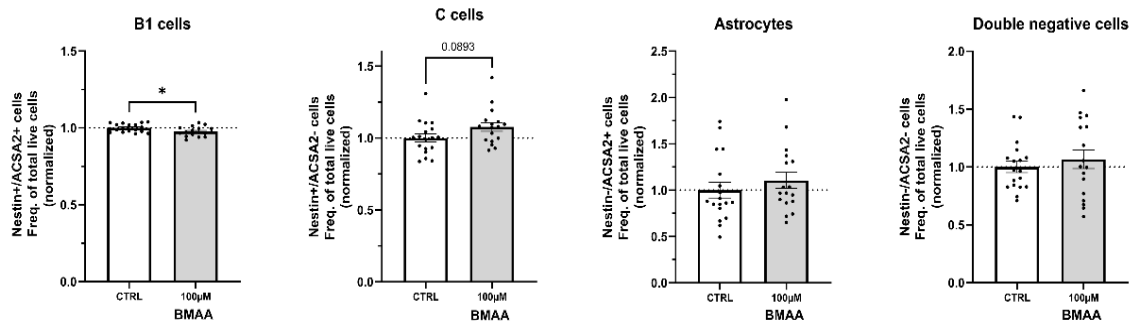


Figure 48 : Effets de la BMAA sur la différenciation des cellules souches neurales (NSCs). Les populations de cellules ont été déterminées par cytométrie de flux ; marquage correspondant aux populations de cellules B1, C et Astrocytes (A). Les gating créés pour exclure les débris cellulaires des populations désirées, correspondant aux événements SSC/FSC très faibles. Seules les cellules individuelles et vivantes ont été sélectionnées, grâce au marquage Live/Dead. Ensuite, les populations ont été sélectionnées en fonction du marquage Nestin et de ACSA2 (B). Quantification des cellules B1, des cellules C, des astrocytes et des autres cellules négatives aux deux marquages après traitement par BMAA (100µM) par rapport aux témoins non traités (C). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM, normalisée (CTRL n = 18 ; BMAA 100 µM n = 17). Les différences statistiques par rapport au contrôle sont indiquées : * p < 0,05 en utilisant le test de Mann-Whitney.

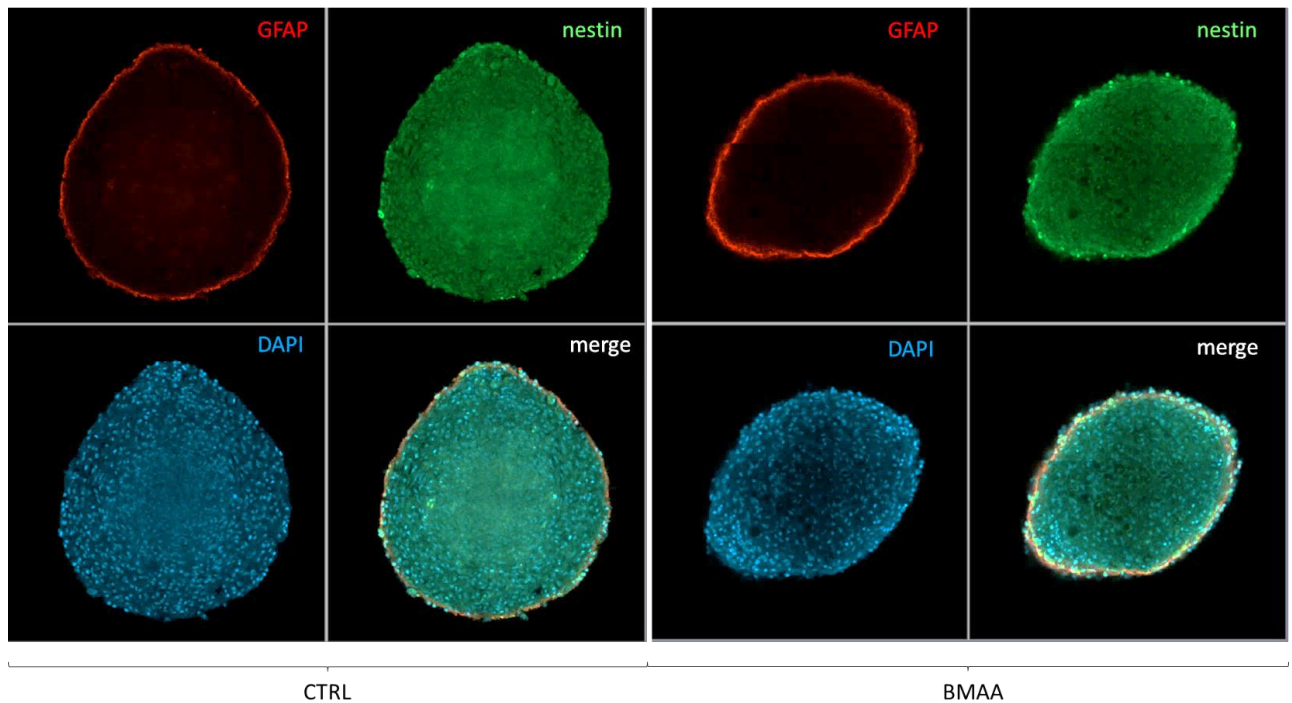
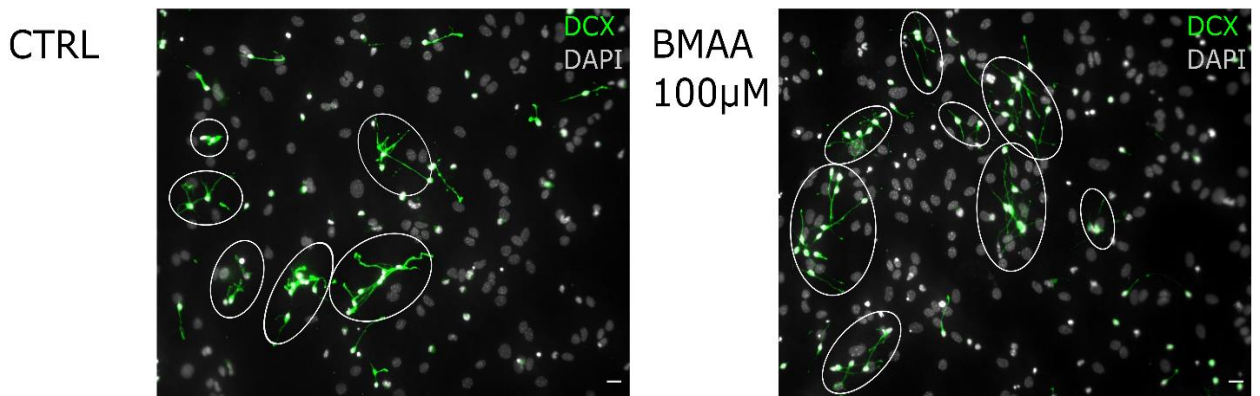


Figure 49 : Microscopie confocale de neurosphères après une semaine de traitement à 100 μ M de BMAA. La position des astrocytes (GFAP+) en bordure et des cellules souches neurales (nestin+) au cœur de la neurosphère peut être perçue. Les noyaux de toutes les cellules sont colorés avec du DAPI. Les images ont été prises à partir de la couche intermédiaire des neurosphères (couche intermédiaire = nombre total de couches/2) au sein du logiciel ZenBlue.

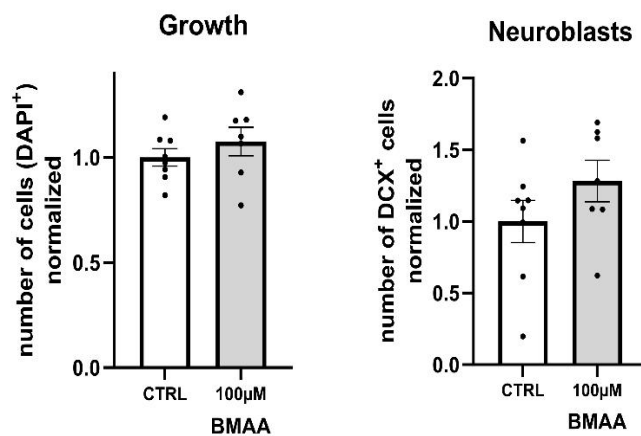
d) La BMAA perturbe l'organisation des neuroblastes au sein du modèle 2D et favorise la migration des neurones immatures selon le test de toxicité pour le développement neurologique (NDT).

L'une des caractéristiques de ce modèle de culture cellulaire est également sa capacité à générer des neuroblastes, à l'instar de ce qui se passe dans la SVZ. Comme dans la situation *in vivo*, ces cellules qui migrent en chaînes et en groupe (« clusters »). Par immunocytochimie, nous avons évalué l'effet de la BMAA sur la population et l'organisation des neuroblastes d'une part sur modèle 2D et d'autre part sur modèle 3D, suivant le même protocole d'exposition. Pour étudier l'organisation des neuroblastes, nous avons considéré que deux cellules contiguës constituaient un groupe et qu'un neuroblaste solitaire était un neuroblaste qui n'était pas dans un groupe. La coloration spécifique des neuroblastes a été réalisée grâce à un anticorps dirigé contre la doublecortine (DCX, Figure 50). La croissance cellulaire basée sur le nombre total de cellules n'a pas été affectée par 100 μ M de BMAA à la fin de la phase de différenciation, pas plus que le nombre de neuroblastes (Figure 50). En revanche, le nombre de groupes de cellules DCX+ a augmenté de manière significative après la différenciation en présence de BMAA, ainsi que la migration (Figure 50–51). Cela indique que l'organisation des neuroblastes a été affectée, au sein du modèle 2D et 3D.

A



B



C

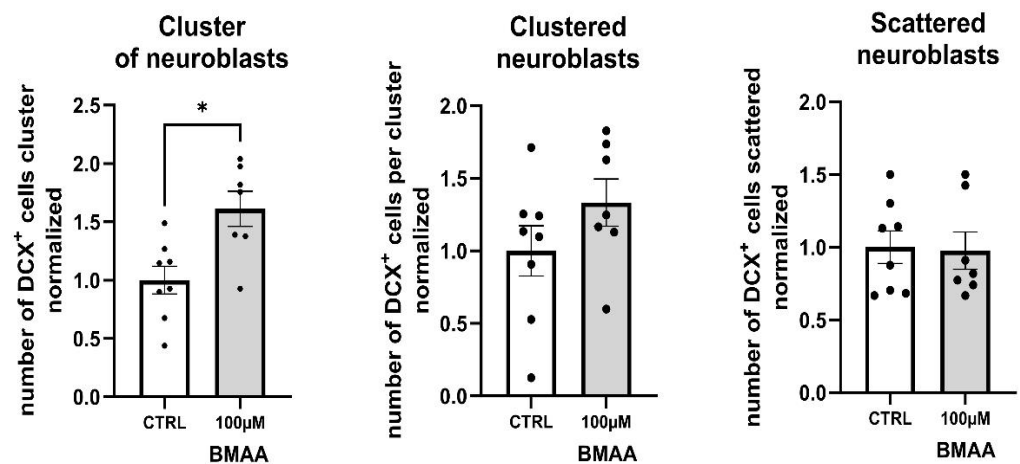


Figure 50 : Effets de 100µM de BMAA sur la population et l'organisation des neuroblastes au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation. Les neuroblastes ont été déterminés par immunocytochimie en utilisant la doublecortin (DCX) comme marquage pour cibler spécifiquement les neurones immatures ; barre d'échelle = 20µm (A). Quantification du nombre total de cellules par champ pour illustrer la croissance et le pourcentage de cellules positives au DCX (B). Quantification de l'organisation des neuroblastes ; nombre de clusters, nombre de neuroblastes par clusters et nombre de neuroblastes dispersés (solitaires) après traitement par la BMAA (100µM) par rapport aux témoins non traités (C). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (CTRL n = 8 ; BMAA 100 µM n = 7). Les différences statistiques sont indiquées : *p < 0,05 en utilisant le test de Mann-Whitney.

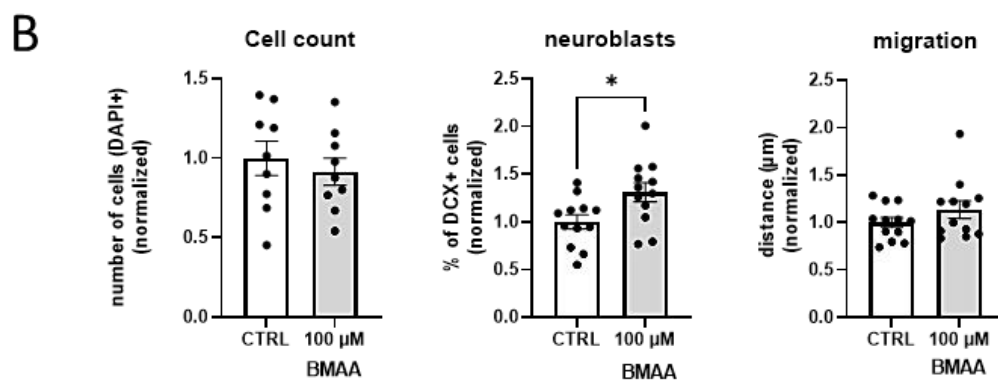
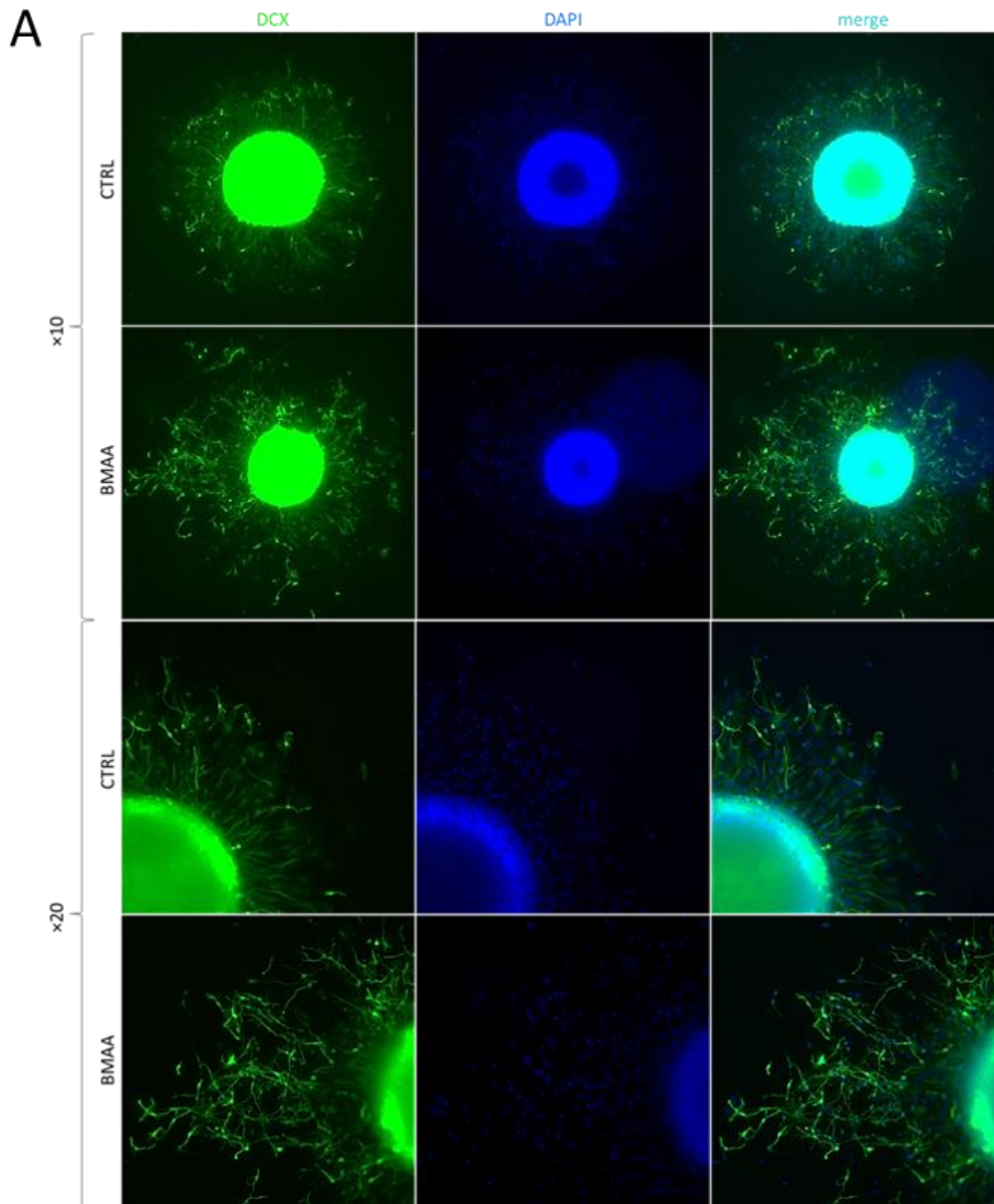


Figure 51 : Microscopie à fluorescence de la population de neuroblastes ayant migrés à partir des neurosphères sur matrigel. La comparaison globale de la migration entre le contrôle et le traitement BMAA 100μM est indiquée à la magnification $\times 10$ et $\times 20$. Cellules totales DAPI en migration ; marqueur spécifique DCX des neuroblastes ; image compilées du marquage DAPI et DCX (A). Nombre de cellules ayant migrées déterminé par les noyaux colorés au DAPI+ ; pourcentage de neuroblastes ayant migré, calculé par les cellules colorées DCX+ et la distance de migration des neuroblastes de la neurosphère mesurée à partir du bord des neurosphères au centre des noyaux colorés DAPI+ des neuroblastes (B). Pour chaque condition, $n=12$. Les valeurs sont normalisées et représentent la moyenne \pm SEM. La différence statistique par rapport au témoin est indiquée par * $p < 0,05$ en utilisant le test de Mann-Whitney.

e) Effets de l'exposition aux BMAA sur l'état inflammatoire des cellules B1 et des astrocytes

Les NSCs peuvent contribuer à modérer la neuro-inflammation, principalement induite par des cellules immunocompétentes telles que les astrocytes et la microglie. Nous avons donc évalué l'effet de la BMAA sur l'état inflammatoire des cellules B1 et des astrocytes par cytométrie de flux. La coloration ACSA2 a été utilisée pour marquer les types de cellules B1 et astrocytes. Nous n'avons pas été en mesure de distinguer ces types de cellules. CD86 est utilisé comme marqueur d'activation de l'état pro-inflammatoire et le récepteur de mannose CD206 comme marqueur des cellules anti-inflammatoires. La BMAA n'a pas affecté la population de cellules B1 et d'astrocytes (Figure 52). Les cellules ACSA2+ présentaient une expression plus élevée de CD86, le phénotype de surface marqueur de l'état pro-inflammatoire, et une expression moindre de CD206, le marqueur de l'état anti-inflammatoire. Pour illustrer l'équilibre entre le statut pro-inflammatoire et anti-inflammatoire, nous avons représenté le rapport CD86/CD206 (327). Après une semaine de traitement, celui-ci est augmenté de façon significative ce qui suggère que les cellules ACSA2+ sont dans un état pro-inflammatoire (Figure 52).

f) Effets de l'exposition à la BMAA sur l'état inflammatoire des cellules microgliales

Notre modèle de culture primaire *in vitro* a également l'avantage de contenir une population de cellules microgliales. Ces cellules sont particulièrement importantes pour la neuro-inflammation mais aussi pour l'homéostasie de la SVZ (295). En effet, les cellules microgliales ont un rôle clé dans la différenciation des cellules souches neurales (267,268). L'activation des cellules microgliales a donc été évalué suite à une exposition chronique de BMAA par cytométrie de flux. Les marquages CD11b et CD45 ont été utilisées pour définir les cellules microgliales et les anticorps dirigés contre CD86 et CD206 ont été utilisées pour déterminer leur état d'activation. Des images représentatives sont présentées et indique qu'un traitement à la BMAA n'a pas affecté la fréquence des cellules microgliales dans la culture des NSCs de la SVZ (Figure 52). Les cellules microgliales ont également montré une plus forte expression de CD86 et une moindre expression de CD206 ; le rapport CD86/CD206 a augmenté de manière drastique après une semaine de traitement par BMAA à 100µM, suggérant que les cellules microgliales étaient également dans un état pro-inflammatoire (Figure 52).

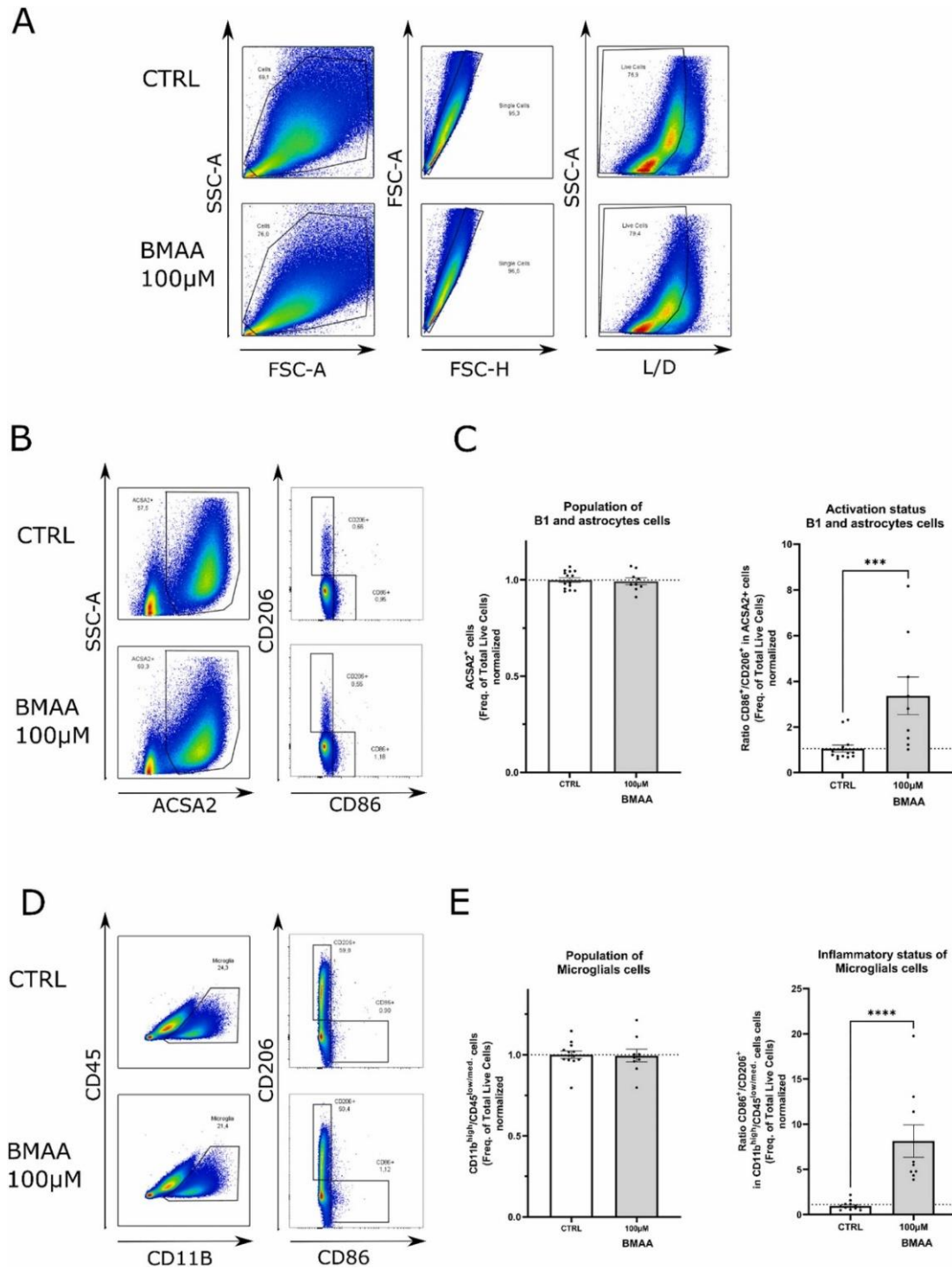


Figure 52 : Effets de la BMAA sur le statut d'activation des cellules ACSA2+ et microgliales au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation. Les populations cellulaires et l'état d'activation ont été déterminés par cytométrie de flux. Un premier gating a d'abord été créé sur les populations sans débris, excluant les événements SSC/FSC très faibles ; les cellules sont ensuite gâtées sur les cellules individuelles et sélectionnées par le Live/Dead (A). Les astrocytes et les cellules B1 ont été sélectionnés comme étant positifs à l'ACSA2 ; l'état d'activation a été déterminé par les marquages CD86 et CD206 (B). Analyse quantitative de la population de cellules ACSA2 + et du rapport entre les cellules CD86 + et les cellules CD206 + après traitement par BMAA (100 µM) par rapport aux témoins non traités (C). Les cellules microgliales sont définies comme CD11b^{high} et CD45^{low/medium} ; l'état d'activation a été déterminé par le marquage CD86 et CD206 (D). Analyse quantitative de la population de cellules microgliales et du rapport entre les cellules CD86+ et les cellules CD206+ après traitement par BMAA (100 µM) par rapport aux contrôles non traités (E). Les valeurs sont normalisées et représentent la moyenne ± SEM (CTRL n = 13 ; BMAA 100 µM n = 9). Les différences statistiques par rapport au contrôle sont indiquées : *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001 en utilisant le test de Mann-Whitney.

g) La BMAA induit une forme amiboïde des cellules microgliales

Compte tenu de l'état pro-inflammatoire suggéré des cellules microgliales exposées à la BMAA en cytométrie en flux, la morphologie de ces cellules a été étudiée par immunocytochimie. Des images représentatives de cellules microgliales Iba1+ sont visibles (Figure 53). En effet, Zanier et al. ont montré que la microglie activée pouvait être caractérisée par sa forme, notamment en termes d'aire, de périmètre, de solidité et de circularité (328). Une microglie à l'état activé, dans sa forme phagocytaire, aura tendance à adopter une forme plus petite, avec peu ou pas de ramification, et arborera ainsi une circularité plus importante qu'une cellule microgliale à l'état de surveillance. Nous montrons ici que l'exposition à la BMAA entraîne des modifications morphologiques des cellules microgliales. En effet, les résultats ont révélé une diminution de plus de 20% de la surface et du périmètre par rapport au contrôle, indiquant que les cellules microgliales étaient plus petites dans les conditions BMAA (Figure 53). L'augmentation significative des paramètres de solidité et de circularité indique une plus grande proportion de microglies en forme amiboïde après l'exposition à la BMAA par rapport aux témoins. Ainsi, les microglies exposées à la BMAA semblent être perturbées par la BMAA et arborer un état plutôt pro-inflammatoire.

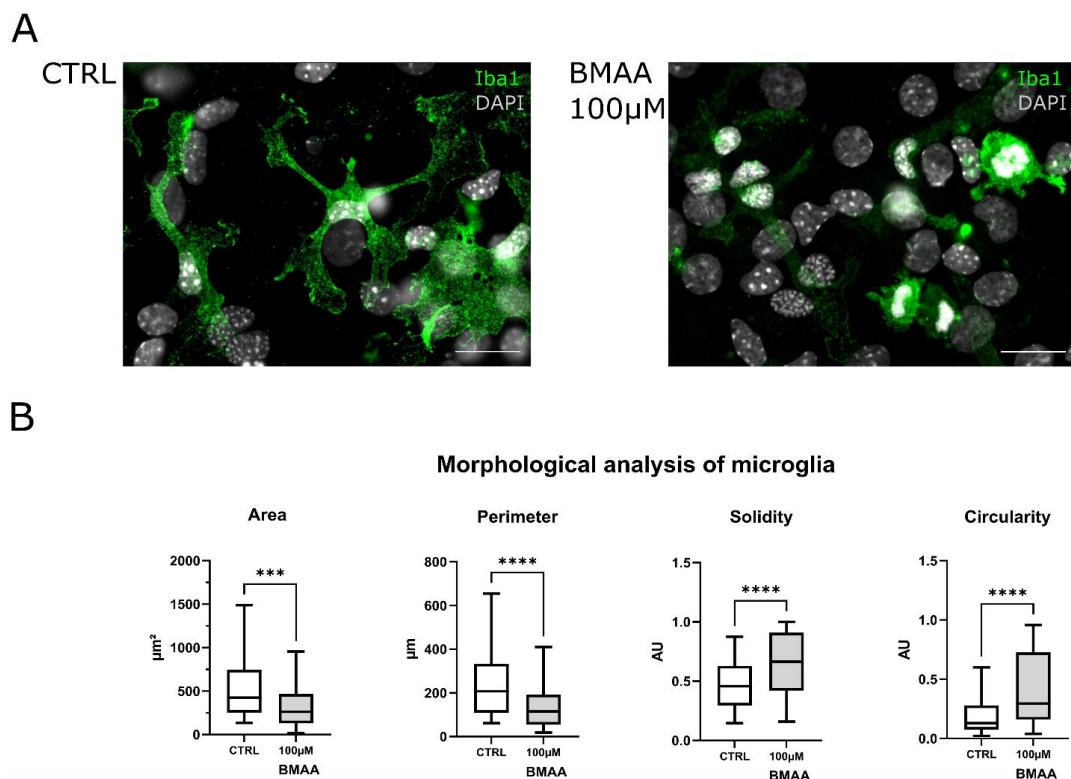


Figure 53 : Effets de la BMAA sur la morphologie des cellules microgliales au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation. La morphologie cellulaire a été déterminée par immunocytochimie ; photographie microscopique représentative du marquage Iba1 pour visualiser la microglie ; barre d'échelle = 20µm (A). Analyse quantitative de la morphologie des cellules microgliales à l'aide du logiciel Image-J. Chaque boxplot résume la mesure de chaque cellule microgliale dans une condition expérimentale ; la surface, le périmètre, la solidité et la circularité ont été analysés après traitement par BMAA (100µM) par rapport aux contrôles non traités (B). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (CTRL n = 44 ; BMAA 100

μM $n = 102$). Les différences statistiques par rapport au contrôle sont indiquées : *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ en utilisant le test de Mann-Whitney.

h) L'exposition au BMAA déclenche la libération de cytokines pro-inflammatoires

Notre modèle de culture cellulaire dérivé des NSC SVZ nous permet d'étudier les interactions entre les populations cellulaires, telles que les astrocytes et la microglie, qui peuvent conduire à la libération de médiateurs de la neuro-inflammation. Ayant observés les cellules immuno-compétentes du SNC en état pro-inflammatoire, nous avons évalué l'effet de la BMAA cette fois sur la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α , qui sont considérés comme les trois médiateurs majeurs de la neuro-inflammation. L'analyse multiplex a montré que l'exposition au BMAA à 100 μM pendant une semaine, induisait une augmentation de la libération d'IL-1 β , de l'IL-6 et de TNF α dans le surnageant (Figure 54). Pour chaque cytokine, l'augmentation était environ double. Ainsi, l'exposition à la cyanotoxine BMAA a déclenché une libération de cytokines pro-inflammatoires dans la culture des NSC SVZ.

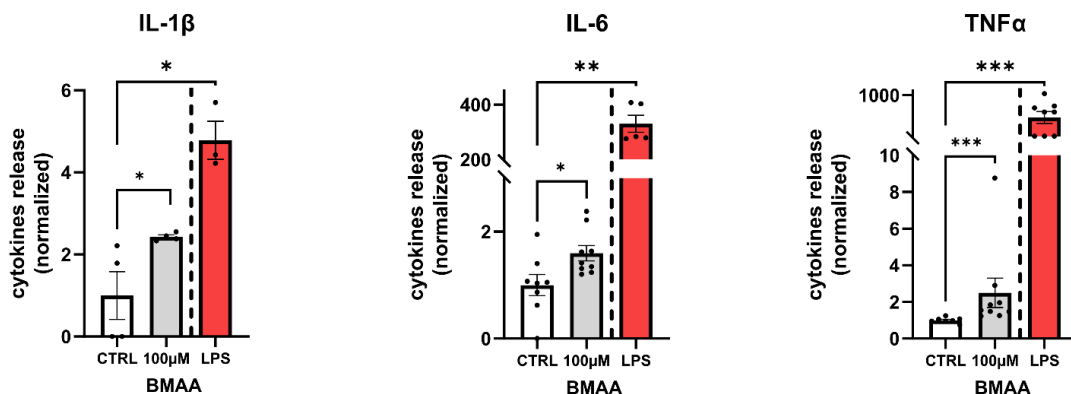


Figure 54 : Effets de la BMAA sur la libération de cytokines pro-inflammatoires au sein d'une culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation. Les niveaux de cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α libérées dans le surnageant après une semaine de culture en absence ou en présence de BMAA (100 μM) ont été mesurés par multiplex. Pour le contrôle positif, les cellules ont été traitées pendant quatre heures avec 100ng/mL de LPS. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM. IL-1 β : CTRL $n = 4$; BMAA 100 μM $n=4$; LPS $n=3$. IL-6 : CTRL $n = 7$; BMAA 100 μM $n = 9$; LPS $n = 5$. TNF α : CTRL $n = 7$; BMAA 100 μM $n = 9$; LPS $n = 8$. Les différences statistiques par rapport au contrôle sont indiquées : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en utilisant le test de Mann-Whitney.

i) L'exposition à la BMAA ne modifie pas les phospho-kinases appartenant à la voie Akt/GSK3 β

Les effets de la BMAA sur la culture primaire des cellules neurogliales peuvent être liés à des changements au niveau protéomique des voies moléculaires associées aux effets inflammatoires et/ou à la différenciation cellulaire. À cet égard, nous nous sommes intéressé notamment à la voie GSK3, impliquée notamment dans les tauopathies. Nous avons détecté avec succès Akt (S473), Akt (T308), β -Caténine, GSK-3 α/β (S21/S9), GSK-3 α (S9), HSP27 (S78/S82), STAT3 (S727), STAT5a/b (Y699), WNK-1 (Y426). Pour chacun d'entre eux, nous n'avons pas observé de différences significatives induites par le traitement à la BMAA dans notre modèle de cultures primaires en 2D (Figure 55).

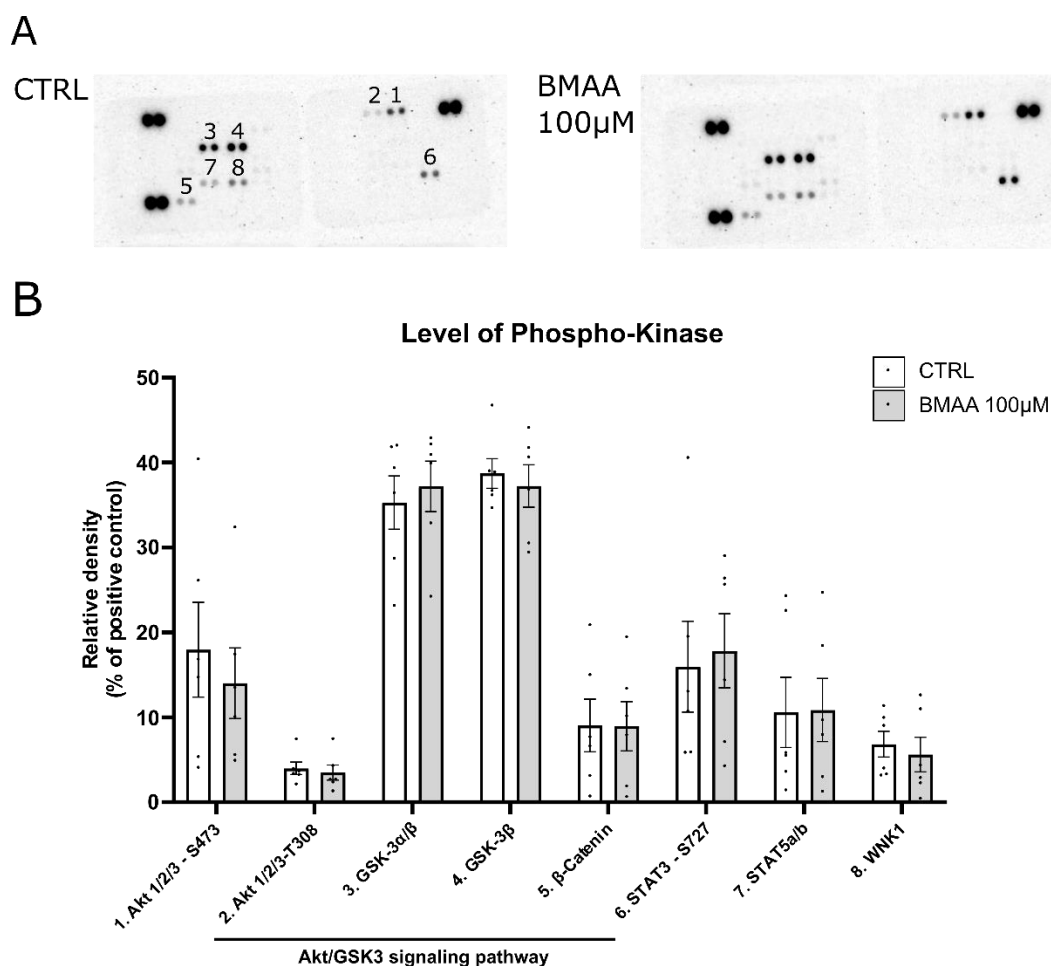


Figure 55 : Evaluation des niveaux de phospho-kinase après une semaine de traitement sur culture de cellules souches neurales (NSCs) avec 100µM de BMAA en cours de différenciation. Photographies du kit phospho-array (A). La quantification du signal moyen (densité de pixels) a été normalisée avec un contrôle positif et analysée parmi les échantillons (B). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM. Les différences statistiques par rapport au contrôle ont été évaluées à l'aide du test multiple de Mann-Whitney.

C. Discussion et conclusions

Le développement du système nerveux central nécessite un équilibre orchestré de manière complexe entre la prolifération des cellules souches neurales multipotentes, la différenciation en types cellulaires appropriés et la migration ultérieure de ces cellules. Au cours du développement du SNC, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires sont très sensibles à l'exposition environnementale (329). Une légère perturbation de ces processus neurodéveloppementaux peut entraîner des altérations du cerveau et pourrait avoir des effets à long terme sur les neuropathologies adultes (330). Nos modèles de culture nous permettent d'évaluer l'impact de toxines telles que la BMAA sur les premiers stades de la neurogenèse. De plus, avons pu évaluer le rôle de l'exposition précoce aux toxines sur les neuropathies impliquant une composante environnementale. En raison de la présence à

la fois d'astrocytes et de cellules microgliales, qui sont les cellules immunocompétentes, nous avons été en mesure d'évaluer la neuro-inflammation.

Nous avons montré que la toxine BMAA augmente la capacité de prolifération des cellules indifférenciées issues de la culture des NSCs dérivées de la SVZ après une semaine d'exposition. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution des cellules B1 et d'une augmentation de la population de cellules C. Sur modèle de neurosphère, nous avons observé une diminution de la taille des neurosphères, ainsi qu'une viabilité moins importante suite à un traitement à la BMAA pendant une semaine à 100µM. Dans le système nerveux, le maintien d'une certaine proportion de chaque population est une condition préalable au maintien d'une structure et d'une fonction normales. La SVZ héberge les NSCs et représente le principal site de neurogenèse primaire et secondaire (331). Dans l'autre niche neurogénique, l'exposition à 100 µM de BMAA a inhibé la différenciation des NSCs en astrocytes, neurones et oligodendrocytes dans le gyrus denté de l'hippocampe (17). Notre étude, mise en relation avec la littérature préexistante, suggère que les effets de la BMAA peuvent différer en fonction de la zone cérébrale et donc du type de cellules (102). En effet, Pierozan et Karlsson ont rapporté que l'exposition à la BMAA réduisait la prolifération des cellules souches neurales striatales (102) et ils ont également montré une augmentation du pourcentage de cellules indifférenciées dans l'hippocampe (17). Ces données ont confirmé une spécification régionale des NSCs comprenant un contrôle moléculaire distinct, des modes de division cellulaire et une sensibilité aux substances toxiques (332). Cela peut notamment expliquer les différences obtenues entre le modèle 2D, en monocouche de cellule et celui d'organoïde cérébral où l'organisation des différents types cellulaires n'est en rien comparable aux modèles 2D. En effet dans le modèle 3D les communications cellulaires sont bien plus accrues, pouvant engendrer des effets différents des cultures conventionnelles ; également, ceux-ci seraient plus représentatifs de l'*in vivo* (317). Considérant que les perturbations au cours de la neurogenèse pourraient entraîner des effets à long terme tels que des maladies neurodégénératives (235,333) l'hypothèse selon laquelle la BMAA pourrait agir comme une toxine neurodéveloppementale et favoriser l'apparition de troubles neurologiques plus tard dans la vie semble renforcée.

De plus, la BMAA agit également sur la migration des neuroblastes chez les rongeurs. Les neuroblastes, qui sont des précurseurs neuronaux, migrent vers le bulbe olfactif pour devenir des interneurones locaux matures chez la souris. *In vivo*, cette migration se produit à travers la paroi latérale du ventricule latéral, où les précurseurs forment des réseaux spécifiques organisés en chaînes jusqu'à ce qu'ils atteignent le bulbe olfactif (238). Ici, nous mettons en évidence pour la première fois que la BMAA modifie ce processus ; d'une part, au sein des cultures 2D, l'organisation des neuroblastes est modifiée : on reporte une augmentation du nombre de clusters. D'autre part, au sein des cultures 3D, on reporte

une augmentation des neurones immatures qui migrent. La désorganisation des neuroblastes a déjà été observé en réponse à une atteinte du SNC (334). Ces regroupements peuvent correspondre *in vivo* à une perturbation de la migration comme précédemment démontré au laboratoire pour un pesticide, analogue structural du glutamate (197). Les mécanismes conduisant à ces altérations impliquent le caractère analogue d'acide aminé de ces composés, qui présente de plus le caractère analogue d'un neurotransmetteur dans les deux cas. Le glutamate, un acide aminé neurotransmetteur, joue un rôle crucial dans la migration des cellules précurseurs neuronales de la SVZ vers le bulbe olfactif (240) La toxine BMAA est définie comme un analogue d'acide aminé et est un agoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) (228). Par ailleurs, il est fortement envisageable que la BMAA pourrait affecter la migration des neuroblastes en s'incorporant mal dans les protéines, en tant que substitut d'acide aminé (335). De plus, la BMAA peut interférer avec la signalisation du glutamate et donc avec les fonctions de la SVZ. En effet, di Giorgi et al. ont mis en évidence l'expression des récepteurs mGlu dans les NSCs ((336). Une telle altération de l'organisation des neuroblastes a été rapportée dans des pathologies telles que les troubles du spectre autistique (TSA) et la maladie d'Alzheimer (337). Nos résultats confortent ici aussi que la BMAA pourrait conduire à une neurogenèse anormale et agir comme une toxine neurodéveloppementale. Cependant, des observations *in vivo* sont nécessaires pour établir un lien entre l'exposition précoce à la BMAA et les neuropathologies tardives ; celles-ci sont actuellement conduites au laboratoire.

Il est important de considérer que la neuro-inflammation peut perturber les processus de neuro-développement. Il a déjà été décrit que l'inflammation peut perturber la migration et l'organisation des neuroblastes (338–340). Au cours du développement, l'existence de phénomènes neuro-inflammatoires anormaux entraînent une plus grande incidence des troubles neurodéveloppementaux, tels que les TSA, la schizophrénie et l'épilepsie (341). Ici, nous avons montré que 100µM de BMAA conduit les astrocytes et la microglie vers un statut pro-inflammatoire dans les NSCs dérivées de la SVZ. L'expression du récepteur au mannose/CD206 est une caractéristique des cellules immunocompétentes anti-inflammatoires, tandis que le récepteur CD86 caractérise le statut d'activation pro-inflammatoire (111). Nous rapportons ici un ratio CD86/CD206 plus élevé chez les cellules immunocompétentes représentées par les astrocytes et la microglie après une exposition à la BMAA. Nous avons émis l'hypothèse que la BMAA pourrait également affecter la migration des neuroblastes indirectement, via ses effets sur les processus neuro-inflammatoires.

Au cours des processus neuro-inflammatoires, l'activité physiologique de la microglie est modifiée (342). Au repos, la microglie surveille son microenvironnement grâce à des processus mobiles et à des ramifications (343). Nous rapportons également des modifications morphologiques telles que la morphologie amiboïde (ou sphérique), caractéristiques d'un statut d'activation pro-inflammatoire Les microglies activées *in vitro* et *in vivo* dans les amiboïdes interagissent étroitement avec les NSCs

résidentes des niches neurogéniques distinctes. La microglie activée a des effets différents sur la prolifération, la migration et la différenciation des NSCs (264). En tant que contrôle positif, l'exposition aiguë au LPS a montré la capacité de notre culture cellulaire à libérer des cytokines pro-inflammatoires. Nos données montrent une augmentation de la libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et TNF α à la suite d'une exposition chronique à la BMAA, ce qui suggère que la neuro-inflammation perturbera l'homéostasie cellulaire. Parmi ces substances, le TNF α est connu pour favoriser la survie des cellules souches neurales et ainsi modéliser la réparation après une inflammation (344). De fait, les NSCs sont connues pour proliférer dans un contexte inflammatoire afin d'inhiber l'inflammation (345,346). Nous avons montré que la BMAA favorise la prolifération des cellules Nestin+ dans la culture des NSCs primaires. Par conséquent, nous pourrions supposer que cette prolifération de cellules indifférenciées pourrait être due au processus inflammatoire via le TNF α afin de réduire l'inflammation.

Silva et al. rapportent que l'exposition à la BMAA a entraîné une augmentation des protéines TLR4 et TLR3, ainsi qu'une transcription accrue de NLRP3 et de pro-IL-1 β dans les neurones corticaux. Cet effet d'augmentation de l'exposition à la BMAA est à la base de l'hypothèse selon laquelle la BMAA induit une neuro-inflammation (347). Par ailleurs, en tant qu'analogue du glutamate, la BMAA peut agir en tant qu'agoniste et activer les mGluR qui sont exprimés dans les astrocytes et la microglie (228). Il est intéressant de noter que l'activation du mGluR5 atténue de manière significative l'activation des cellules immunocompétentes et réduit la réponse induite par le LPS (348,349) Considérant que les formes carbamylées de la BMAA sont des analogues du glutamate, nous étudierons l'effet de la BMAA dans un contexte pro-inflammatoire ultérieurement.

En conclusion, cette première étude, centrée uniquement sur les effets de la cyanotoxine BMAA montre cette molécule analogue d'acide aminé perturbe les processus neuro-inflammatoires. Cette toxicité se caractérise également par un effet sur les processus neurodéveloppementaux affectant potentiellement les populations et les fonctions dérivées de la SVZ. Nous avons également mis en évidence que la BMAA conduit les astrocytes et plus radicalement les cellules de la microglie à un statut pro-inflammatoire. Les effets pro-inflammatoires de la BMAA constituent l'une des premières étapes de la cascade de toxicité de la BMAA et entraînent les pertes neuronales observées dans les neuropathologies associées à cette cyanotoxine. En effet, notre étude montre que la BMAA perturbe la neuro-inflammation dans notre modèle de culture de cellules souches neurales. Des expérimentations sont nécessaires pour comprendre les mécanismes d'action de la BMAA et les cibles moléculaires associés sont nécessaires, les premières explorations effectuées s'étant révélées infructueuses. D'autres facteurs environnementaux pourraient expliquer l'apparition de cas sporadiques. Afin de comprendre précisément l'étiologie des maladies neurologiques sporadiques induites par des polluants, une attention particulière sera donnée à la notion de l'exposome. En effet, en raison du changement

climatique et de l'anthropisation de l'environnement, les proliférations de cyanobactéries deviennent plus fréquentes et la présence de BMAA augmente donc dans le monde entier (25,350,351).

Etude n°2. Etude comparative des effets des toxiques seuls ou en mélange (MIX) sur les populations de cellules issues de la niche neurogénique SVZ et investigation de leurs effets neuro-inflammatoires

A. Contexte de l'étude

Le nombre de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique (SLA) n'a cessé d'augmenter dans le monde au cours de ces dernières années. Si l'augmentation de l'espérance de vie participe à ce constat, des causes extrinsèques au vieillissement de la population sont à envisager. La présence de toxiques dans l'environnement tels que les pesticides (néonicotinoïdes, organophosphorés) pourrait participer au développement de maladie neurodégénérative telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. De plus en plus d'études questionnent l'origine sporadique de ces pathologies, démontrant que ces maladies sont le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux (352). Les mécanismes par lesquels les facteurs génétiques et environnementaux peuvent interagir et favoriser l'apparition de troubles neurologiques font aujourd'hui l'objet de nombreuses recherches en épigénétique.

Par ailleurs, la neuro-inflammation apparaît comme un processus biologique majeur de déstabilisation homéostatique affectant le risque, l'apparition et la progression des maladies neurodégénératives. Les prédispositions génétiques peuvent contribuer à des réponses pro-inflammatoires exacerbées par des agressions environnementales telles que l'exposition aux pesticides (353). Celles-ci peuvent moduler la réponse inflammatoire et ainsi empêcher une réponse physiologique normale, adaptée aux stimuli. Les polluants environnementaux étudiés au cours de cette thèse sont par ailleurs des analogues d'acides aminés et peuvent interagir avec les récepteurs au glutamate (104,173,200).

Il a été démontré que les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR), et plus précisément les mGluR5 (mGluR5) sont impliqués dans l'activation de la microglie induite par le LPS (349). Il a également été démontré au sein de la littérature que les mGluR5 peuvent également être exprimés de façon transitoire par les astrocytes ainsi que par les cellules souches neurales où ils sont notamment impliqués dans la prolifération et la différenciation de ces progéniteurs (354). Une activation des mGluR5 par des agonistes sélectifs tels que le (RS)-2-chloro-5-hydroxyphénylglycine (CHPG) réduit de manière significative l'activation microgliale en réponse au lipopolysaccharide (LPS). Cet effet anti-inflammatoire s'est notamment caractérisé par la réduction de la production d'oxyde nitrique (NO), de ROS, et de la libération de cytokines pro-inflammatoires (349). Ces composés peuvent se retrouver ensemble dans l'environnement puisque la prolifération des microalgues et cyanobactéries productrices de BMAA est favorisée par la présence de ces herbicides (355).

Les maladies neurodégénératives sont susceptibles d'avoir des origines qui prennent racine tôt dans la période du neurodéveloppement (322). Cette période, notamment caractérisée par des processus accrus de neurogenèse, est une période critique et particulièrement sensible à l'exposition aux substances toxiques. Une perturbation au cours de cette période peut donc altérer le développement des structures neuronales et/ou entraîner des conséquences néfastes à court et à long terme (323,324).

La littérature actuelle a d'ores et déjà identifié la BMAA, le glufosinate d'ammonium et le glyphosate comme substance neurotoxique. Concernant la BMAA, des études ont identifié que les cellules souches issues de la niche neurogénique hippocampique avait une sensibilité plus importante à cette cyanotoxine que les neurones primaires. Cette sensibilité se caractérise notamment par l'induction de phénomène apoptotique et une perturbation importante de la différenciation des cellules souches (17,102,121). A l'heure actuelle, si les mécanismes de neurotoxicité font encore l'objet de débat au sein de la communauté scientifique, il semble communément admis que la BMAA peut être mal incorporée au sein des structures protéiques, à la place de la L-sérine, dans les organismes (100,356). Concernant le glufosinate d'ammonium, il a été clairement démontré au laboratoire que l'exposition au GLA altérait la neurogenèse adulte *in vivo* au niveau de la SVZ (197). De plus, il a aussi été montré *in vitro*, et dès 3 μ M, il a été démontré que non seulement le GLA mais également son métabolite possèdent une activité neurotoxique notamment en modifiant les populations différenciées issues des cellules souches neurales, perturbe l'épithélium épendymaire dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) (200) et induisait un stress oxydatif. La littérature scientifique est moins riche concernant l'existence (ou l'absence) des effets du glyphosate sur les phénomènes de neurogenèse à faible dose/concentration. Néanmoins, Masood et al. (170) rapportent qu'à des concentrations autorisées de glyphosate par les autorités de protection de l'environnement dans l'eau potable, le GLY réduit de manière significative la migration cellulaire et la différenciation des NSCs. Ces conclusions se basent sur une régulation à la baisse des niveaux d'expression des gènes de la β -tubuline III neuronale et de la S100 β astrocytaire. L'expression du gène cytoprotecteur CYP1A1 a été régulée à la baisse, tandis que l'expression du gène indicateur de stress oxydatif SOD1 a été régulé à la hausse. Leurs résultats semblent indiquer que non seulement les concentrations admissibles de glyphosate dans l'eau de boisson sont capables de perturber la neurogenèse secondaire mais également que le GLY, à cette concentration peut sensibiliser l'organisme à une atteinte ultérieure.

Il existe assez peu d'études qui se sont intéressées aux effets de ces molécules (BMAA, GLA et GLY) sur les processus neuro-inflammatoires, sur des modèles de culture primaire à faible concentration. Sur lignée cellulaire SH-SY5Y (neuroblastome) le glyphosate (à 5mM) et son métabolite l'AMPA (10mM) induisent un stress oxydatif important ainsi qu'une régulation à la hausse de l'IL-6 (357). Sur culture primaire de neurones corticaux, à 3mM, la BMAA est susceptible d'activer les TLR4 et TLR3, induisant la

translocation de p65 NF- κ B dans le noyau et activant la transcription de NLRP3 et de pro-IL-1 β , supposant une interaction avec les phénomènes neuro-inflammatoires (347).

Nous avons étudié ici l'impact d'une exposition chronique à la BMAA (100 μ M), de glyphosate (GLY, 30 μ M), de glufosinate d'ammonium (GLA, 3 μ M) seules ou en mélange. Ces concentrations sont considérées comme faibles par la littérature scientifique. Les traitements ont été réalisés pendant la différenciation cellulaire, sur culture primaire de NSCs isolées à partir de la SVZ. Après avoir vérifié l'absence d'effet des traitements sur la viabilité cellulaire, nous avons caractérisé les populations cellulaires après une semaine de différenciation. Pour analyser les aspects neuro-inflammatoires, nous avons étudié l'état d'activation des cellules immunocompétentes, les astrocytes et les cellules microgliales ainsi que libération de cytokines pro-inflammatoires induites par les toxiques seuls ou en combinaison. Compte-tenu de leur structure moléculaire, analogue d'acides aminés, nous avons également cherché à déterminer si ceux-ci interféraient avec la réponse inflammatoire induite par le LPS. L'essentiel de cette étude s'est effectuée sur un modèle en deux dimensions en monocouche de cellule (2D) et une partie, exploratoire, a été effectuée sur modèle organoïde cérébral, les neurosphères, baptisées également « mini-cerveaux » du fait de leur capacité à s'auto-organiser. Ce modèle serait plus proche des conditions réelles d'exposition *in vivo* (317).

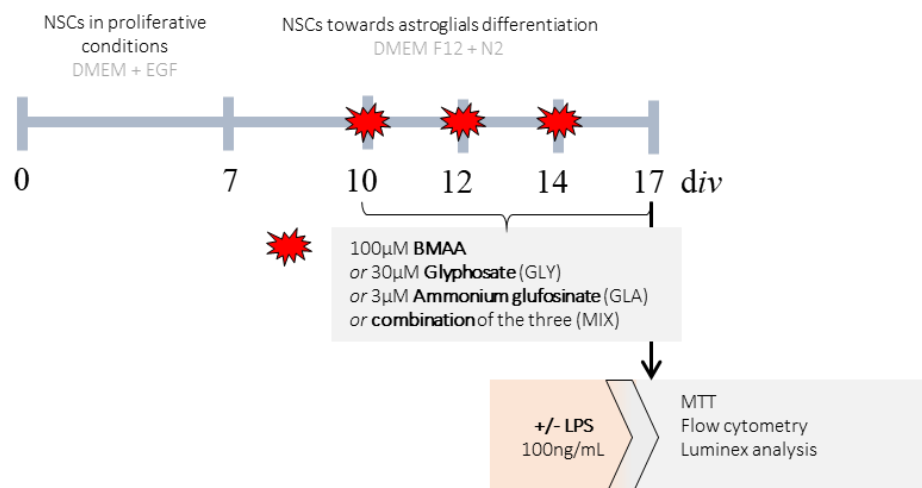


Figure 56 : Protocole expérimental pour l'évaluation des effets de 100 μ M BMAA ou 30 μ M Glyphosate (GLY) ou 3 μ M de glufosinate d'ammonium (GLA) ou une combinaison des trois (MIX) au sein des cultures de NSCs en différenciation. Des NSCs primaires murines *in vitro* ont été isolées de SVZ au jour 0. Après 7 jours dans des conditions prolifératives, les cellules ont été repiquées et maintenues dans le même milieu. Les cellules ont ensuite été traitées tous les deux jours avec les toxiques en même temps que le changement de milieu, permettant la différenciation cellulaire. Après une semaine de traitement, correspondant à trois traitements, la viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT et les populations cellulaires et le statut d'activation ont été définis par cytométrie en flux et la libération de cytokines a été évaluée par test Multiplex.

B. Résultats

a) Absence d'effet des polluants sur la viabilité cellulaire

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer si les toxiques d'intérêt possédaient un effet sur la viabilité des NSCs en différenciation. Les cellules ont donc été traitées à la BMAA à 100 μ M, au glufosinate d'ammonium à 3 μ M (GLA), au glyphosate à 30 μ M (GLY) seuls ou en combinaison (MIX). Les cellules ont été traitées pendant une semaine, à chaque changement de milieu, c'est-à-dire 3 fois (Figure 56, protocole). Ces concentrations ont été choisies en accord avec nos travaux précédents sur le GLA et la BMAA et se basent également sur littérature scientifique. Basée sur celles-ci, elles sont considérées comme faibles.

La viabilité a été évaluée via le test de viabilité au MTT. Celui-ci se base sur l'activité d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Après une semaine de traitement, aucun des trois composés seuls ou en combinaison n'a pas affecté la viabilité cellulaire (Figure 57). Ces concentrations ont été conservées pour les investigations ultérieures.

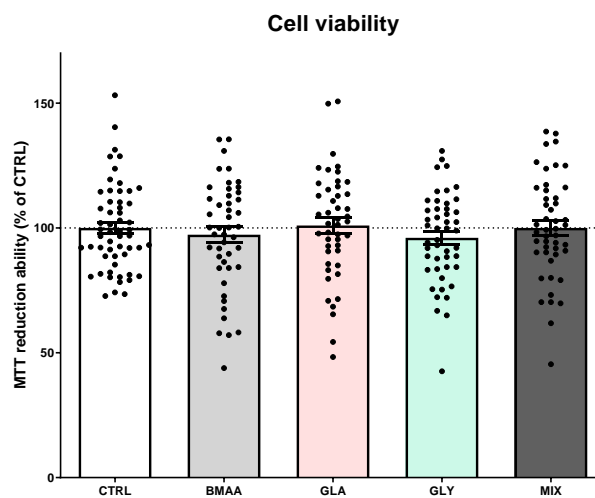


Figure 57 : Effets de 100 μ M de BMAA ou de 30 μ M de glyphosate (GLY) ou de 3 μ M de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur la viabilité cellulaire au sein de culture de cellules souches neurales (NSCs) en différenciation. La viabilité cellulaire a été déterminée à l'aide du test MTT après une semaine de traitement avec des substances toxiques. CTRL n=56 ; BMAA n=47 ; GLA n=48 ; GLY n=47 ; MIX n=48 à partir de trois expériences indépendantes. Les valeurs sont normalisées et représentent la moyenne \pm SEM. Les différences statistiques ont été évaluées à l'aide du test de Kruskal-Wallis.

b) L'exposition aux toxiques seuls ou en combinaison ne semble pas affecter la différenciation cellulaire des NSCs

Par cytométrie en flux, nous avons cherché à caractériser les populations de cellules B1, de cellules C et d'astrocytes à l'aide des marqueurs Nestin et ACSA2 (astrocyte cell surface antigen-2) (Figure 58A). Ainsi, les cellules B1 furent doublement marquées par l'anticorps dirigé contre la protéine Nestin et ACSA2 (*astrocyte cell surface antigen-2*). Les cellules C n'étaient marquées que par la Nestin et les astrocytes possédaient uniquement le marquage ACSA2.

Dans un premier temps, le marquage Live/Dead n'a pas montré de différence significative pour l'ensemble des traitements (Figure 58B). Ensuite, lorsque l'on analyse les populations de cellules B1, celles-ci ne semblent être affectées ni par les molécules seules, ni par la combinaison de la toxine avec les herbicides GLA et GLY (Figure 58C). Concernant la population de cellules C, nous n'observons pas de différences significatives bien qu'une tendance à la hausse soit présente après une semaine de traitement au MIX. La population astrocytaire ne semble pas non plus être affectée par les traitements. Si l'on s'intéresse aux cellules doubles négatives, c'est-à-dire celles qui ne sont ni marquées par ACSA2 ni par Nestine on observe une tendance à la hausse induite par le MIX. Cette hausse pourrait être dû à une prolifération des cellules microgliale.

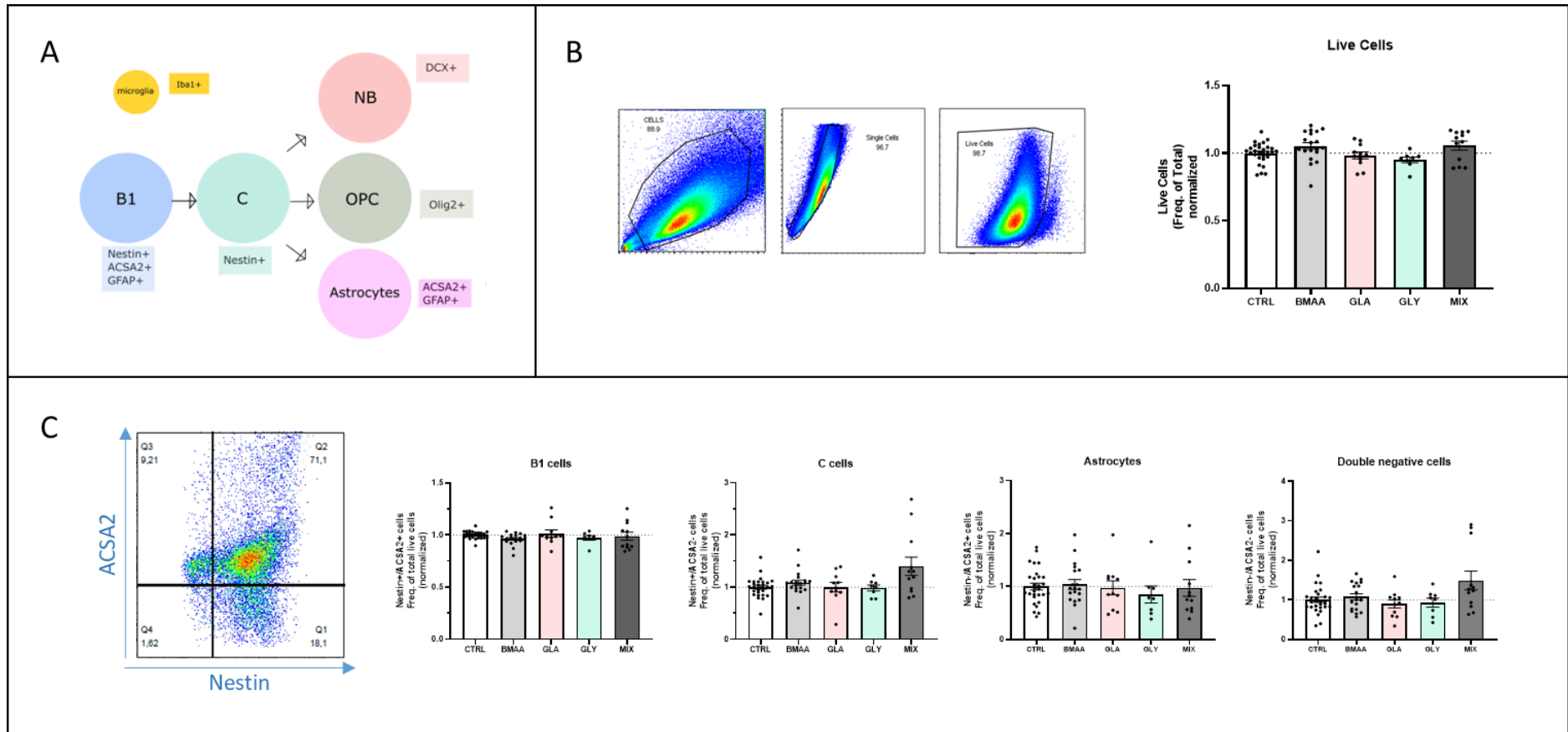


Figure 58 : Effets de 100 μ M de BMAA ou de 30 μ M de glyphosate (GLY) ou de 3 μ M de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur la viabilité cellulaire au sein de culture de cellules souches neurales (NSCs) sur la différenciation cellulaire. Les populations cellulaires ont été déterminées par cytométrie en flux ; marquage pour la détermination des populations cellulaires de cellules B1, C et astrocytes (A). Un gating a été créé sur les populations de cellules de façon à exclure les débris cellulaires, c'est-à-dire les événements SSC/FSC très faibles. Les cellules non individualisées et mortes avec le marquage Live/Dead furent également exclues; quantification suite aux traitements (B). Les populations ont ensuite été déterminées selon les marquages Nestin et ACSA2 ; quantification de B1, C et astrocytes et cellules doubles négatives (C). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM, normalisée. CTRL n=27, BMAA n=19, GLA n=9, GLY n=11, MIX n=12. Les différences statistiques par rapport au contrôle ont été atteintes à l'aide du test de Kruskal-Wallis.

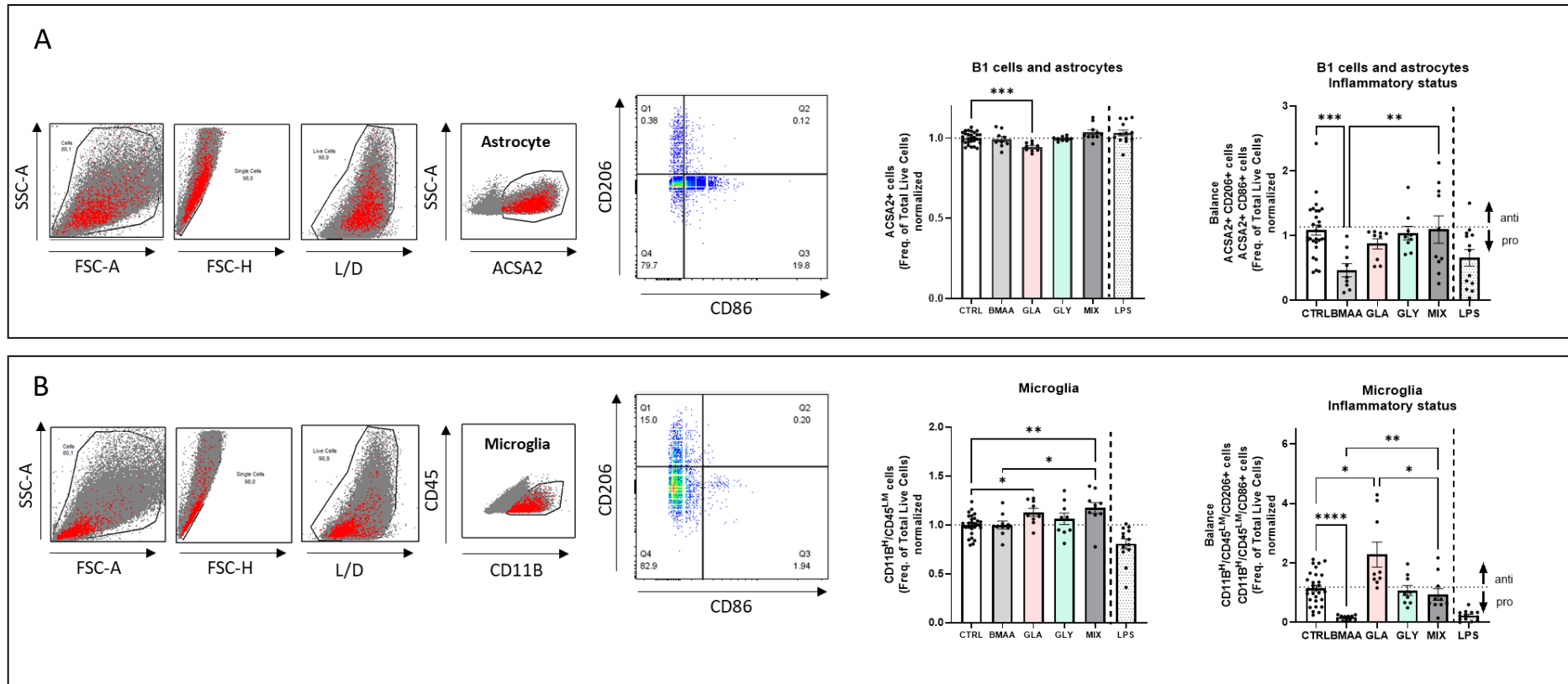


Figure 59 : Effets de 100 μ M de BMAA ou de 30 μ M de Glyphosate (GLY) ou de 3 μ M de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur le statut d'activation des cellules ACSA2+ (B1 et astrocytes) et des cellules microgliales. Les populations cellulaires et le statut d'activation ont été déterminés par cytométrie de flux. Un premier gating a d'abord été créé sur les populations cellulaires en excluant les événements SSC/FSC très faibles ; les cellules sont ensuite gâtées sur les cellules individuelles et vivantes, sélectionnées par la coloration Live/Dead. Les astrocytes et les cellules B1 ont été sélectionnés comme étant positifs à ACSA2 ; l'état d'activation a été déterminé à l'aide des marqueurs CD206 et de CD86 ; analyse quantitative de la population de cellules ACSA2+ et du rapport des cellules CD206+ sur les cellules CD86+ après le traitement par rapport aux témoins non traités (A). Les cellules microgliales ont été classées en CD11b^{high} et CD45^{low/medium} ; l'état d'activation a été déterminé via le marquage de CD86 et CD206 ; analyse quantitative de la population de cellules microgliales et du rapport des cellules CD206+ sur les cellules CD86+ après le traitement (B). Les valeurs sont normalisées et représentent la moyenne \pm SEM (CTRL n = 29 ; BMAA n = 9 ; GLA n = 9 ; GLY n = 10 ; MIX n = 10 ; LPS n = 13). Les différences statistiques, en comparaison au contrôle, sont indiquées : * p < 0,05 ; ** p < 0,001 ; *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001 en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

c) Effets de l'exposition aux toxiques sur les populations de cellules immunocompétentes et leur l'état d'activation

- Effet sur les cellules ACSA2⁺ : les cellules B1 et les astrocytes.

Les NSCs peuvent contribuer à amortir la neuro-inflammation, qui est principalement induite par l'activation des astrocytes et de la microglie. Nous avons donc évalué l'effet des molécules seules et en mélanges sur les populations de cellules positives au marqueur ACSA2, c'est-à-dire les cellules B1 et les astrocytes. Distinguer les cellules B1 et les cellules C aurait demandé un marquage supplémentaire nestin, intracellulaire, que nous n'avons pas été en mesure de faire ici. La BMAA et le GLY n'ont pas affecté la population de cellules ACSA2 positive. Par contre, le GLA a légèrement baissé cette population (d'environ 5%) (Figure 59A). Le MIX n'induit pas de différence de nombre de cellules ACSA2+. Puisque l'on s'intéressait au statut inflammatoire, les cellules ont également été marquées avec CD86, marqueur de l'état pro-inflammatoire et avec le récepteur de mannose CD206, marqueur d'une activation plutôt orientée anti-inflammatoires. Nous avons représenté le ratio CD206/CD86 pour illustrer la balance entre deux des états potentiels d'activation. Nos résultats témoignent qu'une semaine de traitement à la BMAA oriente les cellules ACSA2+ dans un état pro-inflammatoire (ratio inférieur au contrôle, ce qui a été déjà démontré dans l'étude précédente), que le GLA et le GLY sont sans effet inflammatoire apparent sur les cellules B1 et les astrocytes. Enfin, le MIX n'a pas non plus montré d'effet. En conclusion, nous avons noté l'état pro-inflammatoire de la BMAA sur les cellules ACSA2+. Les herbicides ne semblent pas avoir d'effet sur l'activation de ces populations cellulaires ; la combinaison des trois molécules (MIX) ne semble pas avoir d'effet synergique.

- Effet sur les cellules microgliales.

Notre modèle de culture primaire *in vitro* contient une population de cellules microgliale non négligeable qui avoisine les 10%. Dans un premier temps et suite à une semaine de traitement au GLA, on observe une augmentation de la population microgliale d'environ 10% ; en présence du MIX, celle-ci est d'environ 12%. La BMAA et le GLY n'ont pas d'effet sur le nombre de cellules CD11B^{high} et CD45^{low/medium} (Figure 59B). Le LPS, qui induit une stimulation pro-inflammatoire réduit le nombre de cellules microgliales (Figure 59B). Concernant le statut inflammatoire, la BMAA possède ici aussi un effet pro-inflammatoire qui a déjà été discuté. Le GLA induit une activation des cellules microgliale plutôt orientée anti-inflammatoire. Le GLY ne semble pas avoir d'effet sur l'état d'activation des cellules microgliale. De façon très intéressante, nous n'observons pas de déséquilibre du ratio CD206/CD86 suite à une semaine de traitement au MIX.

d) Effets d'une semaine d'exposition aux toxiques seuls ou suivis d'une exposition au LPS sur la réponse pro-inflammatoire

Notre modèle de culture cellulaire dérivé des NSCs de la SVZ nous permet d'étudier les interactions entre les populations cellulaires, telles que les astrocytes et la microglie, qui peuvent conduire à la libération de médiateurs de la neuro-inflammation. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à déterminer les conséquences d'une exposition chronique (1 semaine) sur la libération des trois cytokines clés de la neuro-inflammation : l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α dans le surnageant. L'analyse multiplex a montré que le glufosinate baissait l'état basal de libération de l'IL-6, produite majoritairement par les astrocytes ; l'effet du GLA est similaire sur la libération de TNF α (Figure 60A). Le même effet s'observe après une semaine de traitement au MIX. Le GLY ne semble pas avoir un effet sur la libération des étudiées ici (Figure 60A).

Dans un second temps, nous avons étudié les conséquences d'une pré-exposition aux toxiques sur la réponse pro-inflammatoire induite par le LPS. Pour IL-1 β , les deux herbicides (GLY et GLA) inhibent la réponse physiologique des cellules au LPS ; un effet similaire s'observe avec le MIX (Figure 60B). Pour IL-6, la BMAA et le GLA interfèrent avec la réponse au LPS en diminuant également la libération de cette cytokine pro-inflammatoire dans le surnageants. Un effet similaire s'observe avec le MIX. Le GLY n'a pas d'effet, en comparaison à la condition contrôle, sur la libération d'IL-6. Concernant le TNF α , on observe – de la même façon que pour l'IL-6 – une diminution de la réponse au LPS lorsque les cellules ont été pré-traitées chroniquement à la BMAA, au GLA, et au cocktail de composé (MIX). Fait intéressant, le GLY n'altère pas la réponse au LPS de façon significative (Figure 60B). En conclusion, si on se base sur la libération de l'IL-1 β , la BMAA n'a pas modifié la réponse microgliale au stimuli pro-inflammatoire ; la forme pro-, intracellulaire reste à investiguée. Le GLA semble altérer la réponse pro-inflammatoire physiologique microgliale (médiée par l'IL-1 β), astrocytaire (médiée par IL-6), et affecte également la production de TNF α , qui est produite notamment par les NSCs. Le GLY interfère uniquement sur la libération d'IL-1 β . Sur la base de la libération de l'IL-1 β , les deux herbicides modulent la réponse pro-inflammatoire microgliale.

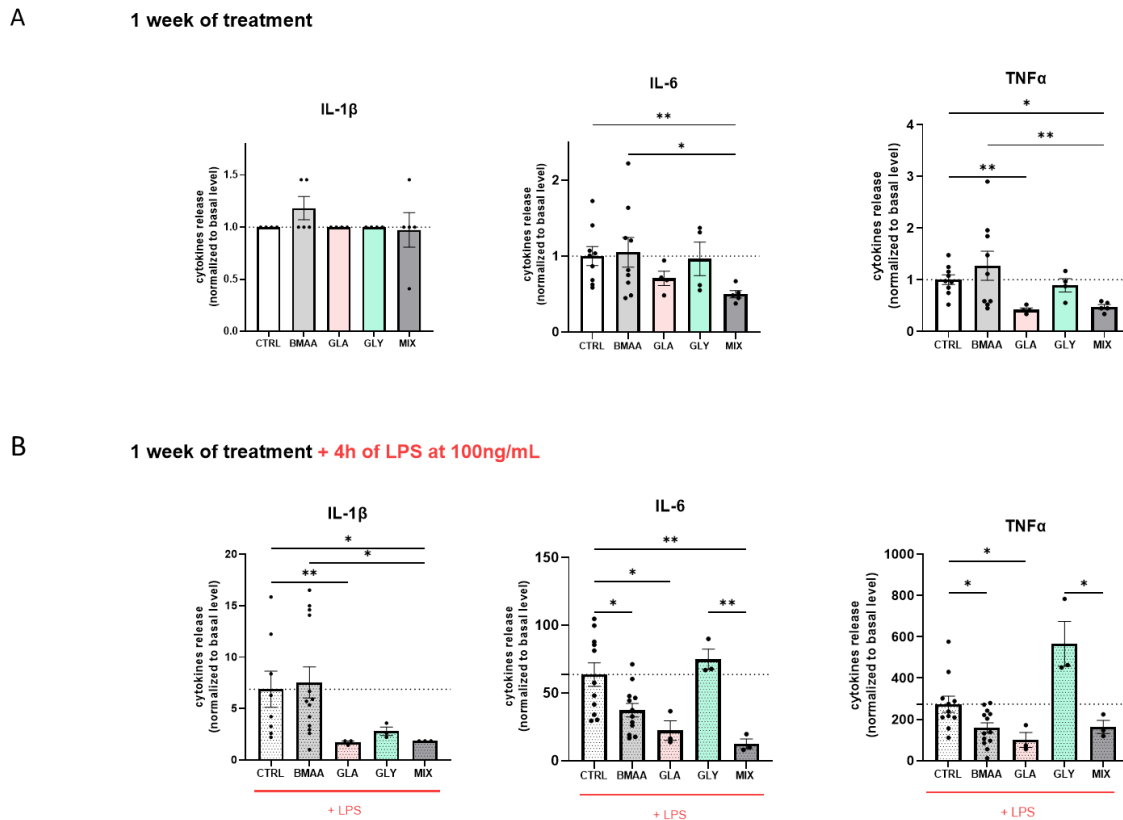


Figure 60 : Effets de 100 μ M de BMAA ou de 30 μ M de Glyphosate (GLY) ou de 3 μ M de glufosinate d'ammonium (GLA) ou d'une combinaison des trois (MIX) sur la libération de cytokines pro-inflammatoires. Les niveaux de libération des cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α dans le surnageant ont été mesurés par ELISA. Après une semaine de traitement, pour IL-1 β : CTRL n=4, BMAA n=5, GLA n=4, GLY n=4, MIX n=5 ; pour IL-6 : CTRL n=9, BMAA n=9, GLA n=4, GLY n=4, MIX n=5 ; pour TNF α : CTRL n=9, BMAA n=9, GLA n=4, GLY n=4, MIX n=5 (A). Après une semaine de traitement suivi de 4h de stimulation pro-inflammatoire bactérienne (LPS à 100ng/mL), pour IL-1 β : CTRL n=8, BMAA n=13, GLA n=3, GLY n=3, MIX n=3 ; pour IL-6 : CTRL n=11, BMAA n=13, GLA n=3, GLY n=3, MIX n=3 ; pour le TNF α : CTRL n=11, BMAA n=13, GLA n=3, GLY n=3, MIX n=3 (B). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM, normalisées. Les différences statistiques par rapport au contrôle ont été recherchées à l'aide du test de Kruskal-Wallis.

e) Effets du cocktail de composés (MIX) sur modèle 3D : effets sur la croissance et la viabilité cellulaire

Nous nous sommes intéressés aux effets du cocktail de composés (MIX) sur les neurosphères, qui sont des organoïdes cérébraux. Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance des neurosphères (Figure 61A). Tout au long du traitement, on s'aperçoit que les neurosphères ayant été exposés au MIX possèdent une taille plus importante que dans la condition contrôle. Cette taille plus importante est corrélée à une viabilité cellulaire « supérieure » à la condition contrôle. Il peut s'agir d'une prolifération accrue induite par le traitement au MIX ou encore d'une diminution des phénomènes apoptotiques.

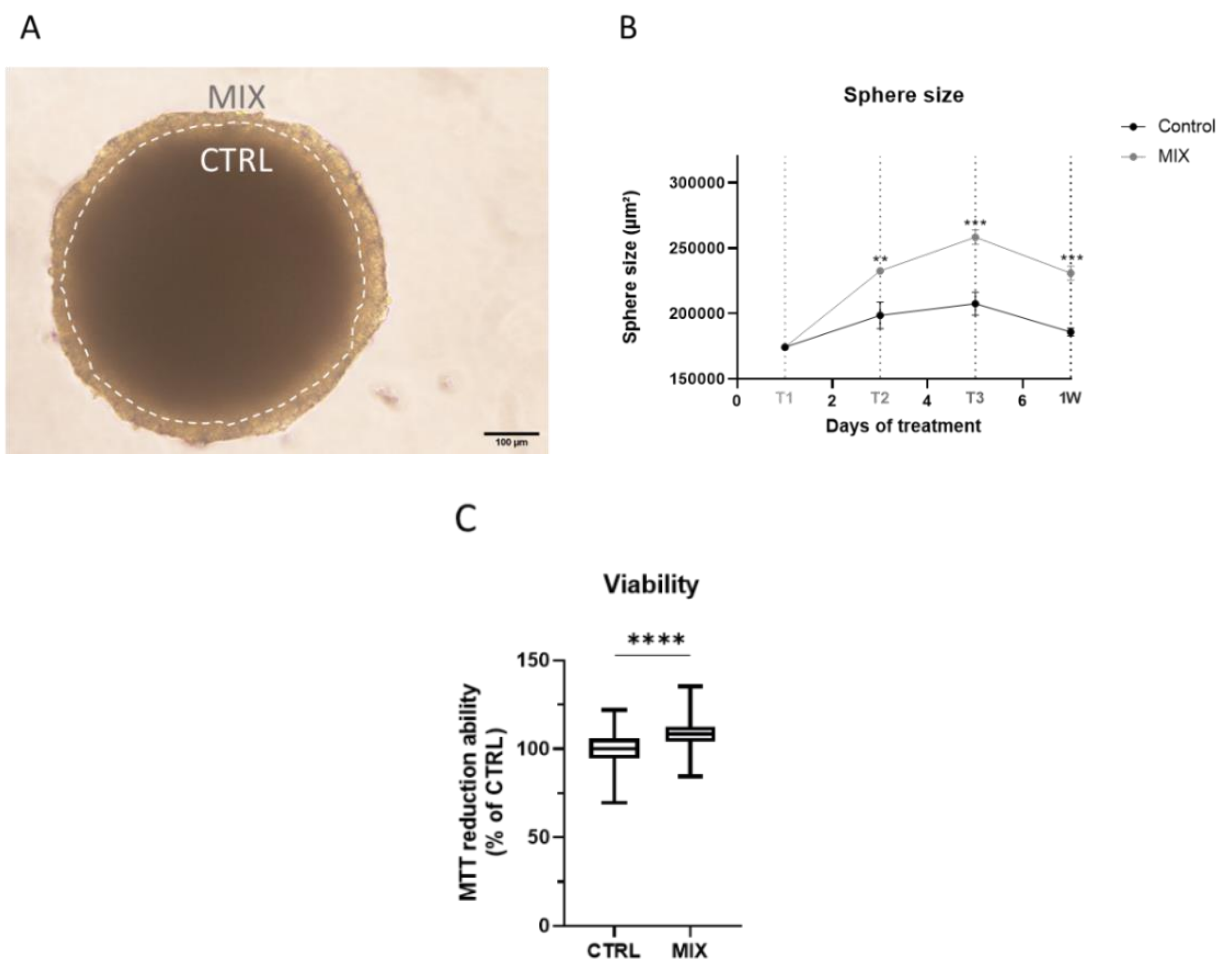


Figure 61 : Observations et mesures des neurosphères après une semaine de traitement au cocktail de polluants (MIX). Photographie d'une neurosphère au microscope à contraste de phase (A). Suivi pendant une semaine de la taille (aire) des neurosphères ; $n > 6$ (B). Mesure au MTT de la viabilité cellulaire après une semaine de traitement au MIX ; $n > 30$ (C). Les différences statistiques ont été recherchées en utilisant le test de Mann-Whitney.

h) Effets du cocktail de composés (MIX) sur modèle 3D : effets sur la différenciation cellulaire

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une exposition au MIX sur les populations de cellules positives aux marquages ACSA2/GFAP. Ces deux marquages ciblent les populations de cellules B1 et les astrocytes, qui sont différenciés à partir des cellules C. Par cytométrie en flux, nous avons observé une diminution des populations positives à ACSA2. Ces différences n'étaient pas observables au sein des culture 2D. Lorsque l'on a étudié l'expression des gènes Nestin (cellules B1 et C) et GFAP on observait également une diminution de l'expression (Figure 62). Il est important de noter que les gènes Nestin et GFAP ne sont pas uniquement impliqués dans la différenciation cellulaire.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux populations de cellules microgliales. Nous avons observé une prolifération de ces cellules (+25%). Cette prolifération était également observée dans les modèles 2D mais dans des proportions moindres (15% environ). Par RT-qPCR, nous observons

une uprégulation de *Itgam* (*Integrin alpha M*) qui est exprimé spécifiquement par les cellules microgliales. *Itgam* apparaît à partir de E9.5 chez les rongeurs (358). On observe aussi la présence du marqueur *Tmem119* qui est exprimé *in vivo* par les cellules microgliales à partir de P10 chez la souris (359). Aucune différence n'a été observée pour ce marqueur (Figure 62).

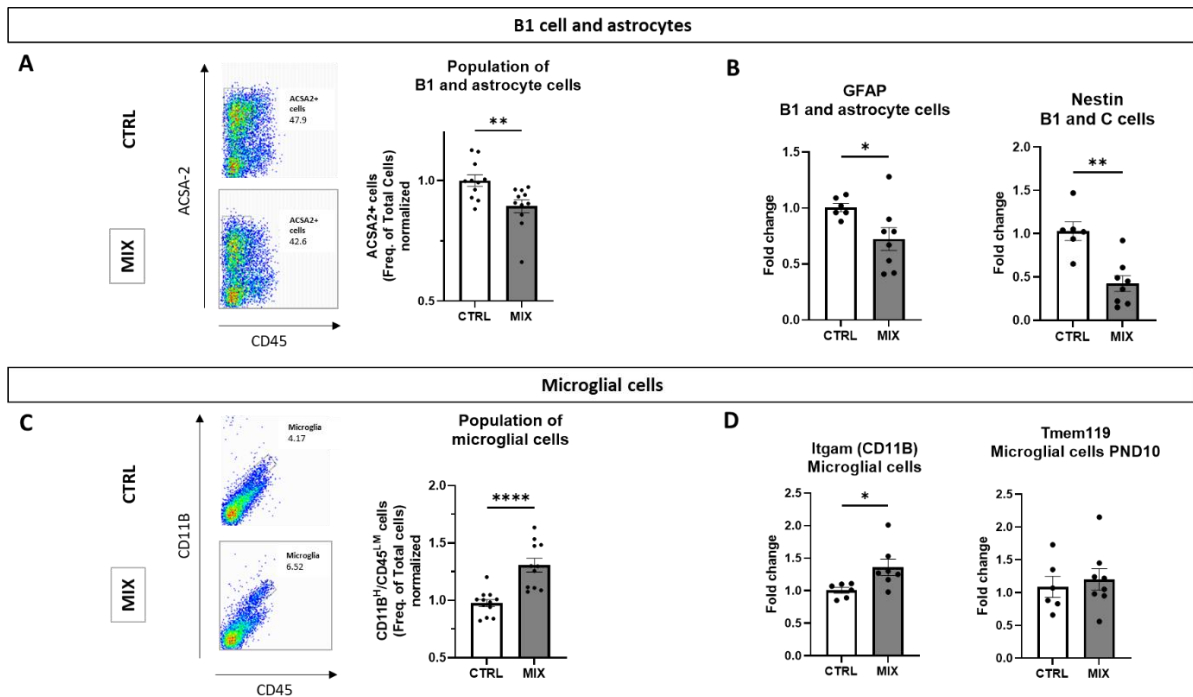


Figure 62 : Etude des populations ACSA2+/GFAP+ et des populations de cellules microgliales suite à un traitement d'une semaine au cocktail de composés (MIX). Etude en cytométrie en flux des populations positives au marqueur ACSA2 et GFAP, les cellules B1 et les astrocytes suite aux traitements ; CTRL n=11 MIX n=11 (A). Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes GFAP (cellules B1 et astrocytes) et Nestin (cellules B1 et C) après traitement ; CTRL n=6 MIX n=8 (B). Etude en cytométrie en flux des populations de cellules microgliales, marquées par CD11B et CD45 suite aux traitements ; CTRL n=12 MIX n=11 (C). Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes *Itgam* et *Tmem119* après traitement ; CTRL n=6 MIX n=8 (D). Les valeurs, normalisées, représentent la moyenne \pm SEM. Les différences statistiques ont été recherchées en utilisant le test de Mann-Whitney.

i) Effets du cocktail de composés (MIX) sur modèle 3D : effets sur la production et la libération de cytokines

Nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une exposition au MIX sur la production et la libération de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF α . Cette analyse a été faite en multiplex. L'exposition au MIX n'a pas modifié la concentration d'IL-6 au sein des lysats cellulaires ainsi que des surnageants. En revanche, une exposition au MIX a augmenté la libération de TNF α dans le milieu mais nous n'avons pas observé une production supérieure au sein des lysats (Figure 63).

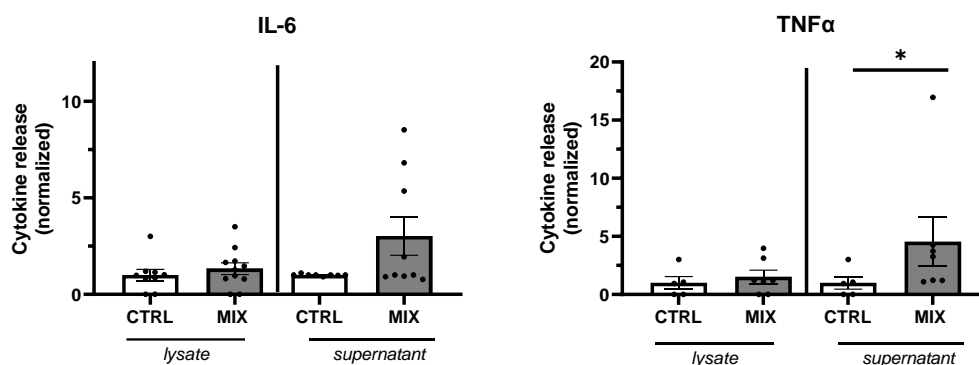


Figure 63 : Effets du cocktail de polluants (MIX) sur la libération de cytokines et pro-inflammatoires. Niveaux de libération de l'IL-6 (à gauche), du TNFα (à droite). Pour IL-6: CTRL n=9, MIX n=11 (lysats) ; CTRL n=8, MIX n=9 (surnageants) ; TNFα: CTRL n=5, MIX n=7 (lysats) ; CTRL n=5, MIX n=7 (surnageants). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM, normalisées. Les différences statistiques ont été recherchées en utilisant le test de Kruskal-Wallis.

j) Effets du cocktail de composés (MIX) sur modèle 3D : effets sur l'expression de Nfkb, Stat3 et Il-6

Afin d'affiner nos données sur la neuro-inflammation induite, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une exposition au MIX sur l'expression de gènes impliqués notamment dans ces phénomènes neuro-inflammatoires à savoir Nfkb, Stat3 et l'Il-6. Pour ces trois gènes d'intérêts nous avons mesuré une baisse d'expression d'environ 40% (Figure 64).

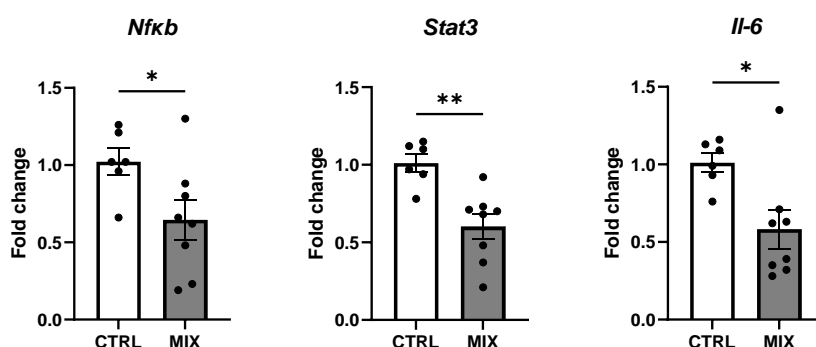


Figure 64 : Effets du cocktail de polluants (MIX) sur l'expression de Nfkb, Stat3, Il-6. Niveaux d'expression après une semaine de traitement ; CTRL n=6 ; MIX n=8. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM, normalisées. Les différences statistiques ont été recherchées en utilisant le test de Mann-Whitney.

C. Discussions et conclusions

L'objectif de cette étude fut d'étudier *in vitro* les effets neurotoxiques et neuro-inflammatoires de trois molécules : la BMAA, le glyphosate et le glufosinate d'ammonium. Ces trois polluants, naturels ou anthropiques sont structurellement analogues d'acides aminés. De façon isolées ou combinées, nous avons étudié ces molécules à faibles concentrations sur des modèles *in vitro* en 2D (monocouche de

culture) ou 3D (organoïdes cérébraux). Concernant les effets individuels de la BMAA ceux-ci furent davantage explorés en amont lors de la précédente étude ; de ce fait, la discussion sera ici consacrée aux effets du cocktail de composés et aux effets individuels des herbicides.

A des concentrations non cytotoxiques, nous avons dans un premier temps pu identifier que ni les molécules seules ni la combinaison de celles-ci ne semblait avoir d'effet sur la différenciation cellulaire des cellules souches neurales ; en effet, par cytométrie en flux nous ne constatons pas de différence pour les proportions des cellules B1 et C. Néanmoins, nous observons une tendance – non significative – à une augmentation des cellules doubles négatives : c'est-à-dire qui ne sont ni positives au marqueur Nestin (cellules B1 et cellules C) ni positive à ACSA2 qui cible les cellules B1 ainsi que les astrocytes. Les types cellulaires qui peuvent être impliqués ici sont les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC), les neuroblastes, ainsi que les cellules microgliales.

Les cellules microgliales sont, avec les astrocytes, les principales cellules immunitaires du cerveau. Celles-ci sont en mesure de répondre aux modifications de l'environnement cellulaire. Cette réponse débute par une activation de ces deux types cellulaires. Leur activation peut se manifester par des changements dans la morphologie, la prolifération et la migration de ces populations (360). Une neuro-inflammation peut *in fine* se caractériser par la sécrétion de cytokines inflammatoires et de facteurs trophiques. Pour autant, un état pro-inflammatoire n'est pas synonyme de neurotoxicité de la même façon qu'un état anti-inflammatoire n'est pas synonyme d'effets neuroprotecteurs. L'analyse des effets neuro-inflammatoires doit considérer le contexte cellulaire ainsi que l'équilibre entre les médiateurs de cette inflammation.

Par cytométrie en flux, nous pouvons souligner certains paramètres qui indiquent que les polluants interagissent avec les cellules immunocompétentes du SNC. Concernant les cellules microgliales, nous constatons que ces cellules prolifèrent en présence de glufosinate d'ammonium ainsi que suite à l'exposition au cocktail de composés ; cet effet n'a pas été observé en réponse à une exposition à la BMAA ou au glyphosate. De façon intéressante cette induction de prolifération par les polluants ne semble pas être reliée à des effets pro-inflammatoires. Le glufosinate d'ammonium semble polariser les cellules microgliales en état anti-inflammatoire et le MIX ne semble pas modifier la polarisation, en comparaison au contrôle. Cela semble indiquer que les molécules étudiées ici peuvent avoir des cibles communes en terme de signalisation cellulaire. La présence des herbicides glyphosate et glufosinate d'ammonium modifie la réponse immunitaire pro-inflammatoire induite par la BMAA au sein du MIX, indiquant une interaction des composés entre eux. Concernant les astrocytes, cette population semble légèrement affectée par une exposition au glufosinate d'ammonium et seule la BMAA modifie le statut inflammatoire.

L'activation des cellules immuno-compétentes du SNC se caractérise également par un impact sur la libération de médiateurs de l'inflammation. Par des études de multiplex, nous avons mesuré la libération de l'IL-1 β – principalement émise par les cellules microgliales –, la libération de l'IL-6 majoritairement astrocytaire ainsi que le relargage de TNF α . Nos résultats montrent que les polluants anthropiques et naturels n'induisent pas une libération excessive des cytokines pro-inflammatoires. Concernant l'IL-1 β aucun des composés seuls ou en mélange n'augmente sa concentration dans les surnageants de culture. Ce qui doit être souligné ici c'est que le MIX réduit l'émission basale de l'IL-6 ; seule une tendance fut observée en présence du glufosinate d'ammonium. Concernant le TNF α on observe trois effets différents avec les trois molécules. Pour la BMAA, l'effet observé est plutôt pro-inflammatoire ; le GLA réduit l'émission basale ; le GLY est sans effet et la combinaison des trois composés suit le profil du GLA.

En tant qu'analogue aux récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs), ces trois composés peuvent agir en tant qu'agoniste (partiel ou non) ou antagoniste (174,200,228). Les mGluR suscitent beaucoup d'intérêt dans le domaine de la neuro-inflammation. Actuellement, à notre connaissance, aucune donnée de la littérature ne fait état d'interaction de ses composés avec la réponse physiologique au LPS. Dans notre étude, lorsque l'exposition chronique fut suivie d'un court challenge inflammatoire au LPS, nos résultats suggèrent une modulation négative de l'activation inflammatoire par les polluants. De façon intéressante le glyphosate module uniquement le relargage de l'IL-1 β , microgliale. Alors que ces molécules sont considérées par ailleurs comme pro-inflammatoires sur d'autres modèles, notamment animaux, nos résultats identifient davantage ces molécules comme perturbateurs de la réponse neuro-inflammatoires.

Décrites pour la première fois par Reynolds et ses collaborateurs en 1992, les neurosphères sont un modèle d'étude du développement neurologique dans la santé et la maladie. Multicellulaires et hétérogènes, les neurosphères permettent une différenciation cellulaire accrue, en comparaison des modèles 2D, des populations de cellules progénitrices/immatures. L'un des avantages de l'utilisation de neurosphères 3D par rapport à la culture cellulaire 2D classique est une meilleure représentation de l'architecture du cerveau (317). Ainsi, l'exposition n'est pas tout à fait identique aux cultures 2D ; sur une culture en monocouche, du fait de l'organisation plane, l'ensemble des cellules reçoivent le polluant présent dans le milieu de culture. En revanche, sur une culture de cellules en 3D il est probable que seules les cellules en périphérie soient directement en contact avec la substance ; des effets indirects peuvent avoir lieu du fait de la mise en place de communication cellulaire accrue. Dans cette étude exploratoire, on remarque que l'exposition au MIX engendre une concentration plus importante du TNF α dans le surnageant – traduisant une libération –, mais pas de sa concentration intracellulaire. Dans l'étude précédente, nous avons pu remarquer que les astrocytes arboraient la périphérie des sphères

tandis que les cellule souches étaient davantage au cœur de celle-ci. La communication intercellulaire pourrait engendrer une libération du TNF α , consistant un mécanisme de défense, par les cellules en réponse à l'exposition aux toxiques (361). En comparaison à la condition contrôle, nous avons aussi remarqué qu'une exposition au MIX réduisait l'expression de gènes liés de *Nfkb*, *Stat3*, *Il-6*. Ces résultats sur modèle neurosphères sont préliminaires mais semblent aussi indiquer que les molécules présentes sous forme de cocktail interagissent avec les voies de signalisation cellulaire liées à la neuro-inflammation. En effet, ces gènes sont notamment impliqués dans les voies de signalisation cellulaire impliquant les TLR, récepteurs clés au sein des processus neuro-inflammatoires (362).

Au sein du SNC, les mGluR ne sont pas les seuls récepteurs impliqués dans les phénomènes neuro-inflammatoires. Entre autres, nous pouvons citer les récepteurs NLR (Nod-like receptors), exprimés par les cellules gliales tels que NLRP1, NLRP3 et NLRC4. Ces récepteurs forment des complexes multiprotéiques appelés inflammasomes, qui jouent un rôle clé dans la régulation de la réponse inflammatoire et de la production de cytokines (363). Dans l'état actuel de la littérature, il n'existe pas d'étude ayant démontré une absence ou une présence d'interaction entre les herbicides et les NLR. En revanche, concernant les récepteurs TLR (*Toll Like receptor*) dans le SNC, qui sont chargés de détecter les signaux inflammatoires, pour mettre en place les mécanismes de défense Silva et al. ont rapporté que la BMAA augmente les niveaux de TLR3 et TLR4 au sein des neurones corticaux (347). Il n'y a pas d'étude qui mette en avant une activation directe des TLR par le glyphosate (162). Il n'y a pas non plus de données concernant l'implication du glufosinate dans l'expression des TLR, néanmoins nous avons démontré au laboratoire que le glufosinate d'ammonium pouvait augmenter *in vitro* et au sein de modèle de culture identique les niveaux de ROS (Feat-Vetel et al., en préparation).

En conclusion, les trois polluants étudiés ici ne semblent pas avoir d'effet synergique concernant les paramètres étudiés ici. L'effet majeur que nous observons est une prolifération des cellules microgliales en présence du cocktail de polluant (en 2D et 3D) ; cet effet fut également observé suite à l'exposition par le glufosinate d'ammonium. Nous avons également observé la faculté du glufosinate d'ammonium et de la BMAA à activer les cellules immunocompétentes du SNC (avec une polarisation différente). Les trois molécules étudiées ici sont capables d'interagir avec la réponse physiologique normale induite par le LPS. Les mêmes expositions furent réalisées au sein d'un autre modèle de culture, contenant uniquement des astrocytes et des cellules microgliales ; les mêmes effets inhibiteurs furent observés après une semaine d'exposition, mais absentes après 24h d'exposition (données non montrées).

Cela étant, malgré leur analogie structurale d'acide aminés, les trois polluants peuvent ne pas agir sur les mêmes cibles cellulaires / moléculaires. L'étude des voies de signalisation impliquant les mGluR5 doit être approfondie ; en effet, le blocage de ces récepteurs par des antagonistes spécifiques a permis

de restaurer le même phénotype contrôle suite à un traitement à la BMAA (17) ainsi qu'au glufosinate d'ammonium (200). La littérature existante fait état de rôles essentiels des mGluR5 dans la protection contre la neuro-inflammation, qui, lorsqu'elle est perturbée, peut contribuer à l'apparition de pathologie telles que les maladies neurodégénératives dont la MP et la MA (83,349). Au sein des études toxicologiques, il est important de se rapprocher au plus possible de la notion d'exposome. L'apparition des maladies neurodégénératives est souvent liée à des facteurs prédisposants, tels que des facteurs environnementaux, qui peuvent induire une sensibilisation des cellules du SNC pendant son développement. De nombreux troubles neuropsychiatriques seraient liés à des effets de sensibilisation gliale, selon laquelle une exposition ultérieure déclencherait l'apparition de neuropathologies. En effet, le développement du SNC nécessite un équilibre précis et orchestré de manière complexe entre la prolifération des cellules souches neurales multipotentes et les cellules différenciées. Une légère perturbation de ces processus neurodéveloppementaux, telles qu'une exposition à des facteurs environnementaux neurotoxiques, peut entraîner des altérations du cerveau et pourrait avoir des effets à long terme sur le développement de neuropathologies adultes (330).

Discussion

l) Contexte économique et écologique

L'utilisation de produits chimiques dans l'agriculture conventionnelle soulève des interrogations et inquiétudes depuis plusieurs décennies. Le recours à ces composés, tels que les néonicotinoïdes et les organophosphorés, peuvent avoir des répercussions à de nombreuses échelles. Ces conséquences peuvent avoir des répercussions directes sur la santé humaine, notamment en raison de la non sélectivité des produits utilisés, ou indirectes en raison de leur impact sur l'environnement.

Les polluants d'origine anthropique étudiés ici sont le glyphosate et le glufosinate d'ammonium. En raison des effets sur la santé humaine, l'utilisation du glufosinate est interdite depuis 2017 en France. Concernant le glyphosate, en janvier 2019, la loi française sur l'agriculture et l'alimentation, connue sous le nom de loi "EGalim", a été adoptée. Celle-ci prévoyait une interdiction de l'utilisation du glyphosate en France d'ici 2023. Il est important de prendre en considération que la réglementation française diffère de la réglementation européenne ; ainsi un pesticide peut être interdit en France mais néanmoins être présent dans notre alimentation.

Certaines substances actives peinent à être interdites, car elles répondent à des questions économiques. En effet, selon le conseil des droits de l'homme des Nations unies, le marché des pesticides pèse 47 milliards d'euros par an. Les multinationales (Bayer/Monsanto, Syngenta) bénéficiant de ces revenus véhiculent la croyance que le retrait des pesticides au sein de l'agriculture mènerait à une famine mondiale, du fait de baisse de rendements considérables. Or, le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), identifie que les cultures consommatrices de pesticides sont principalement consacrées à l'huile de palme ainsi qu'au soja. Ces cultures sont massivement responsables de la déforestation et ne visent pas directement à nourrir les populations vulnérables afin de réduire la famine au sein des pays défavorisés. Concrètement il semblerait que l'arrêt des pesticides conduise à une diversification globale de l'alimentation et à une réduction des produits carnés. Ainsi, l'argument de l'augmentation de la population mondiale ne semble pas être satisfaisant pour justifier la poursuite de l'utilisation de ces composés chimiques.

L'utilisation des herbicides a en effet dommageable considérable pour l'environnement : persistance dans les sols, effets néfastes sur les insectes pollinisateurs, contamination des réseaux trophiques... Cette contamination des réseaux trophiques a notamment des effets « silencieux ». Par exemple, les pesticides et principalement les insecticides, sont susceptibles d'agir sur la santé des oiseaux, du fait de leur régime alimentaire insectivore. Ils peuvent causer des dommages sur leur foie, l'encéphale, et vont également être responsables de la fragilisation de la coquille des œufs qui peut se rompre lors de la couvaison (364,365). Les pesticides dérèglent également les hormones thyroïdiennes, indispensables au vol et à la migration des oiseaux, comme le coucou et l'hirondelle. Les hormones thyroïdiennes sont

essentielles pour la prise de poids et le maintien de la masse musculaire (366–368). Ainsi, à cause de l'interférence des pesticides, les oiseaux voient leur navigation aérienne altérée. On parle d'effets silencieux car, comme l'a souligné Grégoire Loïs au sein du podcast « pour que nature vive » du Musée National d'Histoire Naturelle (MNHN), les rivières ne sont pas jonchées de cadavres d'oiseau ; ce sont (aussi) les populations d'oiseaux qui ne se renouvellent pas. La publication, en 1962, de l'ouvrage « *Silent Spring* » de Rachel Carson a participé à rendre public l'effondrement de la biodiversité. Ce titre a été inspiré d'un poème de John Keats, La Belle Dame sans merci, dans lequel figure les lignes « *The sedge is wither'd from the lake, And no birds sing* » ; ce qui signifie en français : « La laïche [plante vivace] est fanée près du lac, et nul oiseau ne chante. ». L'auteure considère que ces substances chimiques devraient être renommées « biocides » car, de façon indirecte ou directe, elles portent atteintes à l'ensemble de la biosphère, jusqu'aux « super-prédateurs ». Les super-prédateurs (*apex predator* en écologie) sont des prédateurs qui occupent les niveaux trophiques les plus élevés. De ce fait, ils sont représentatifs de l'état de santé du milieu car ils sont exposés aux contaminants sur une longue durée de vie notamment via leur alimentation. Certains produits chimiques sont susceptibles de se bioaccumuler dans l'organisme et ainsi de se bioamplifier à des concentrations élevées dans la chaîne alimentaire. Le déclin des populations de grands prédateurs a été l'un des impacts les plus alarmants de la pollution chimique et a poussé les pouvoirs publics à adopter des traités visant à réduire cette pollution (EC, (2020)¹). En effet, la persistance et la bioaccumulation des produits chimiques peuvent entraîner une exposition chronique à des niveaux élevés et imprévisibles. Ainsi, un certain nombre de cadres réglementaires traitent spécifiquement de la bioaccumulation chez les prédateurs supérieurs, comme la Convention de Stockholm où sont évalués les polluants selon leurs pouvoirs persistants, bioaccumulables et toxiques (EC (2000)²).

L'espèce humaine est considérée comme super-prédatrice ; celle-ci peut donc non seulement être exposée de façon aiguë aux pesticides, comme lors de cas d'empoisonnement involontaire ou volontaire mais également de façon chronique. Cela peut être le cas pour les populations d'agriculteurs dans les milieux ruraux, les populations voisines qui sont exposés par voies aériennes, ou les consommateurs des produits traités qui y sont exposés par la voie orale. En toxicologie et pharmacologie les voies d'expositions sont des paramètres importants à considérer. Le cerveau, composant du SNC, est l'un des organes pouvant être ciblé par les pesticides. Certaines substances

¹ EC 2020 : European Commission (EC) - Chemicals Strategy for Sustainability - Towards a Toxic-Free Environment Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions 2020).

² EC2000: EC (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy 2000.

peuvent avoir des effets néfastes en raison de leur capacité à traverser les barrières naturelles du corps humains, telles que la barrière hémato-encéphalique, ou la barrière placentaire ; ils peuvent ainsi être présents dans le liquide amniotique. C'est notamment le cas de la BMAA, qui est de plus capable de se bioaccumuler au sein des œufs d'oiseaux. Cela questionne sur l'effet de cette toxine sur le développement des oiseaux mais également sur la quantité des denrées alimentaires, produits animaux et végétaux, pouvant contenir la neurotoxine (106).

II) Toxicité des analogues d'acides aminés : BMAA, Glyphosate et glufosinate d'ammonium

Concernant la BMAA, l'un des questionnements majeurs concerne sa responsabilité avec certaines maladies neurodégénératives telles que le cas particulier d'ALS/PDC. Bien que de nombreuses observations aient confirmé son rôle potentiel, les doses et concentrations testées dans des modèles sélectionnés (*in vivo* et *in vitro*) ont été jugées, dans la plupart des cas, trop élevées par rapport aux valeurs réelles d'exposition environnementale. A cet égard, plusieurs observations doivent être prises en compte tels que la bioamplification, les éventuels effets cocktails qui pourraient tenir compte des interactions additives ou synergiques ainsi que la période d'exposition de la BMAA, importante à considérer. Au sein de cette étude, il fut question de modéliser *in vitro* les effets *in vivo* induits par la BMAA, analogue de la sérine, en prenant en compte que sa présence était concomitante avec celle du glyphosate et du glufosinate d'ammonium. Lorsque le projet ANR a débuté, il n'existait aucune étude étudiant les éventuelles interactions des composés – la BMAA et les deux herbicides – entre eux. En revanche, il était fortement suspecté que la BMAA pourrait être une neurotoxine du développement et que ses effets neurotoxiques pourraient tirer leur origine lors des processus de neurogenèse (17,102,195) Les précédentes études menées au laboratoire avaient elles aussi identifiées le glufosinate d'ammonium comme toxique pour le développement du système nerveux central. Peu d'études ont cherché à étudier les effets du glyphosate sur les phénomènes de neurogenèse. Il a néanmoins été démontré qu'à de très faibles concentrations de glyphosate, équivalentes à celles autorisées dans l'eau « potable », la migration et la différenciation cellulaire des cellules souches neurales issues de la SVZ étaient perturbées (170).

Les données du CEA recueillies par Justyne Feat-Vetel, Olivier Etienne et Thierry Kortulewsky de l'équipe de François Boussin ne soulignent pas d'effet synergique des composés entre eux. Aux doses étudiées, ils ont néanmoins confirmé que la fenêtre d'exposition (E15,5) était cruciale pour observer des effets néfastes, notamment sur la neurogenèse. Ils ont relevé une prolifération des cellules microgliales suite à une exposition au GLA, BMAA ainsi que le MIX (Figure 64). Au sein de nos modèles de culture (2D et

3D), nous observons également une prolifération des cellules microgliales avec le MIX, ainsi que le glufosinate, mais pas avec la toxine seule.

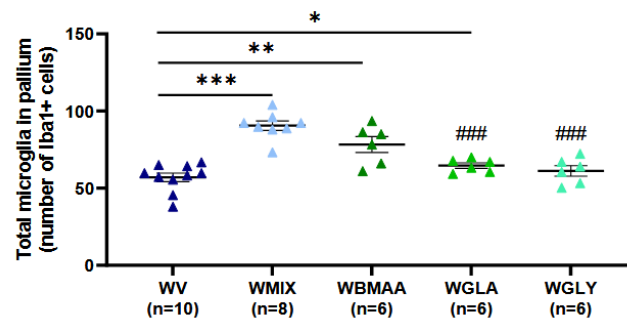


Figure 65 : Augmentation du nombre de cellules microgliale chez les embryons de souris ayant été exposées aux molécules, seules ou en combinaison (Feat-Vetel et al., en préparation).

Leurs immunohistochimies, réalisées sur des coupes de cerveau total chez les souriceaux exposés via leur mère, ont permis d'identifier que la BMAA engendrait un changement morphologique des cellules microgliales, qui deviennent amiboïdes comme nous avons pu l'observer *in vitro*. Nous n'avons pas évalué les modifications morphologiques des cellules « *macrophage-like* » résidentes du SNC *in vitro* mais l'équipe du CEA observe les mêmes altérations pour le glufosinate d'ammonium et le MIX ; le glyphosate demeure sans effet pour ce paramètre (Figure 64). Ils ont également mesuré l'expression protéique des marqueurs CD86 et CD206, représentatifs de marqueurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Concernant la BMAA les effets observés furent similaires aux nôtres *in vitro* : les cellules microgliales adoptaient un statut pro-inflammatoire chez la mère ainsi que chez l'embryon. Concernant les autres molécules, et leur combinaison, les tendances observées ont été également similaires aux nôtres mais le *n* demeure à être complété pour dresser des conclusions solides quant à la similarité des effets neuro-inflammatoires observés. Il doit cependant être relevé que l'utilisation du marqueur CD86 en tant que marqueur pro-inflammatoire ne fait pas consensus au sein de la littérature ; certains auteurs le classent comme marqueur d'activation, sans lui attribuer de rôle pro- ou anti-inflammatoire ; cela étant la minocycline, antibiotique de la famille des cyclines, établit comme anti-inflammatoire, inhibe la polarisation de la microglie en état « M1 », c'est-à-dire pro-inflammatoire (369)

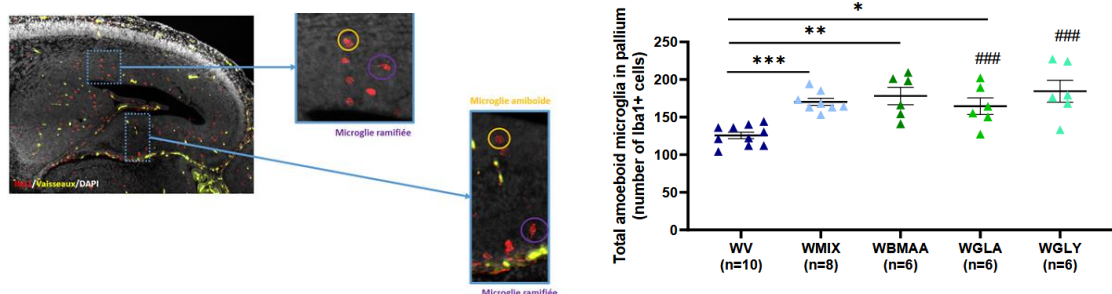


Figure 66 : Altération de la morphologie des cellules microgliales chez les embryons de souris ayant été exposées aux molécules seules ou en combinaison via leur mère. Quantification réalisée à partir d'immunocytochimie Iba1+. (Feat-Vetel et al., CEA, en préparation).

L'excitotoxicité ainsi que l'inflammation seraient les principaux acteurs de la toxicité induite par la BMAA, via leur capacité à interagir avec les systèmes glutamatergiques (108,120,347,370). Ces deux phénomènes sont intrinsèquement liés puisque l'excitotoxicité du glutamate via les récepteurs NMDA est impliquée dans la neuro-inflammation dans certains modèles animaux de la MA (371). Nos résultats semblent aller dans ce sens puisque nous avons identifié la BMAA comme perturbant la réponse inflammatoire basale et physiologique en réponse au LPS. Un effet similaire fut observé en présence du glufosinate et du MIX. Le glyphosate semble quant à lui plus discret quant à son interaction avec les défenses inflammatoires au sein des cultures de cellules souches en différenciation. Il est intéressant de souligner que ces effets inhibiteurs furent observés uniquement après une semaine de traitement et non à 48h ou 96h, mettant ainsi en lumière l'importance de la chronicité du traitement. De plus, si nos résultats confirment ceux de Pierozan (17) visant à démontrer que la neurotoxine est toxique pour les cellules souches neurales, nous avons observé les mêmes effets lorsque nous avons répété le protocole uniquement sur les astrocytes et les cellules microgliales ; en effet nous observons une inhibition de la réponse pro-inflammatoire médiée par IL-6. Cela laisse sous-entendre que les effets toxiques de la BMAA ne résulteraient pas de l'interactions des cellules souches avec les cellules immunocompétentes. Nos résultats font échos avec ceux obtenus *in vivo* par Asma Oummedi. Ceux-ci montrent qu'une exposition inflammatoire asymptomatique (antérieure ou ultérieure) peut-être à l'origine d'effets observés, notamment moteurs, à long terme lorsqu'elle est associée à une exposition à de faibles doses de xénobiotiques, suggérant une interaction réelle, présente à l'échelle de l'organisme, entre les molécules analogues d'acides aminés et la réponse inflammatoire physiologique. De façon intéressante, il a été démontré que les mGluR de type I, regroupant notamment les mGluR5, dont nos molécules sont agonistes, pourraient avoir un lien avec la progression ou l'exagération de MND telles que la MP (372,373). L'une des pistes à explorer serait de vérifier l'absence des effets observés en présence de ces inhibiteurs afin de valider (ou d'infirmer) les voies de signalisation cellulaires

impliquées. L'étude de Pierozan met en avant que 100 μ M de BMAA sur une culture primaire de cellules du bulbe olfactif entraînait une perturbation du réseau neuritique ainsi qu'une réduction de la viabilité cellulaire. L'antagoniste des récepteurs NMDA MK-801 et l'antagoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate MCPG ont protégé contre les altérations induites par la BMAA, démontrant l'importance des mécanismes glutamatergiques. L'antagoniste des récepteurs ionotropiques non-NMDA CNQX a empêché la diminution de la viabilité cellulaire induite par la BMAA dans les cultures mixtes contenant à la fois des cellules neuronales et gliales, mais pas dans les cultures ne contenant que des neurones, ce qui suggère un rôle des interactions neuronales-gliales et des récepteurs AMPA gliaux dans la toxicité induite par la BMAA (Figure 66).

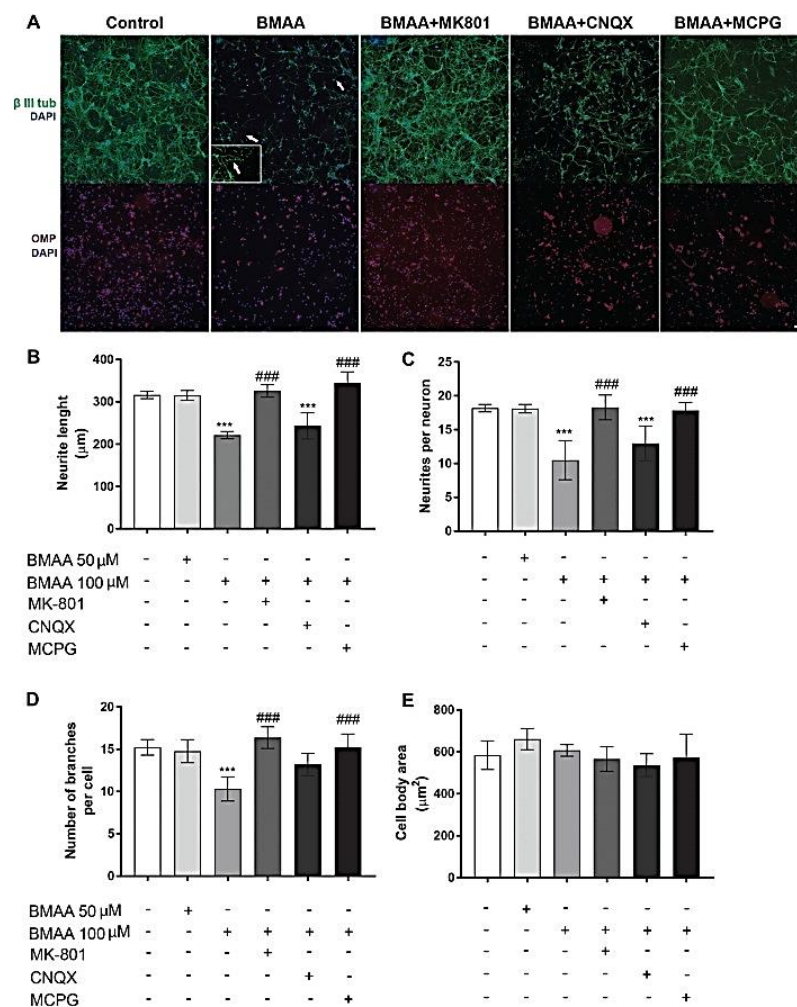


Figure 67 : Altérations morphométriques induites par la BMAA dans les neurones primaires du bulbe olfactif de la souris. (A) Images représentatives de cellules exposées à la BMAA pendant 24h ou prétraitées et co-exposées à l'antagoniste NMDAR MK-801, à l'antagoniste mGluR MCPG ou à l'antagoniste ionotropique non NMDAR CNQX. Les cultures de cellules primaires de souris ont été immunocolorées avec de l'anti- β III-tubuline (vert), de l'anti-OMP (rouge) et du DAPI (bleu). Des varicosités dendritiques sont présentes dans les neurones olfactifs traités avec 100 μ M de BMAA (flèches). Les images ont été capturées avec un système d'analyse à haut contenu ImageXpress ; **(B)** Longueur des neurites ; **(C)** Processus dendritiques par cellule ; **(D)** les branches par cellule ; **(E)** la surface du corps cellulaire (17).

Dans notre étude des résultats préliminaires laissent supposer que différents mécanismes peuvent être en jeu. A l'heure actuelle, nous cherchons à déterminer si l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire

induite par le LPS impliquerait les mGluR5. Pour cela, les cellules ont été pré-traitées au MCPG avant de recevoir le traitement à la BMAA. Le *n* demeure à être renforcé, il semble que nous observions une restauration de la réponse concernant l'IL-6 ainsi que le TNF α . Concernant l'IL-1 β , nous n'observons pas d'inhibition de la réponse au LPS (Figure 59, étude n°2) et l'inhibiteur ne semble pas avoir d'effet. A propos de l'IL-10, la BMAA semble réduire également la réponse au LPS et il semble que nous observions une restauration partielle de la réponse physiologique en présence de l'inhibiteur MCPG (Figure 67). La restauration partielle de la réponse induite au LPS peut être expliquée par l'implication d'autres récepteurs glutamatergiques.

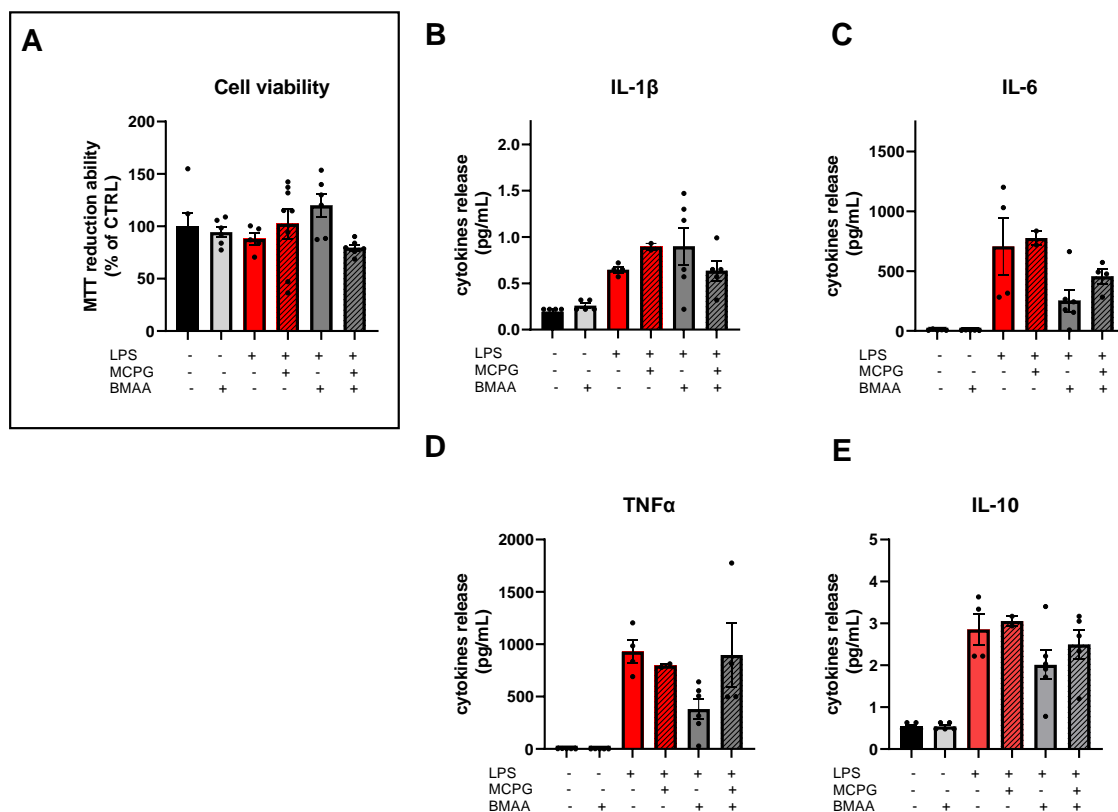


Figure 68 : Mesure de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) et anti-inflammatoire (IL-10). 30min avant le traitement à la BMAA les cellules ont été pré-traitées avec l'inhibiteur MCPG. Mesure de la viabilité cellulaire (A). Evaluation de la réponse à l'IL-1 β (B). Evaluation de la réponse à l'IL-6 (C). Evaluation de la réponse au TNF α (D). Evaluation de la réponse à l'IL-10 (E).

La BMAA semble cibler des voies de signalisation cellulaire distinctes selon le type cellulaire étudié. Des études sont actuellement en cours pour comprendre les mécanismes sous-jacents à l'origine des effets de la BMAA. Un focus est fait sur les mGluR5, exprimés par les astrocytes, la microglie ainsi que les cellules souches neurales (374). Il est intéressant de noter qu'au sein de la niche neurogénique SVZ les cellules souches apparaissent comme la principale source de glutamate (375).

La neurogenèse secondaire est identifiée comme acteur de neuroplasticité, permettant au cerveau de s'adapter aux stimuli intrinsèques et extrinsèques. Ce processus n'est pas statique, mais soumis à une

régulation dynamique par divers signaux environnementaux physiologiques, pathologiques, extrinsèques et des stimuli pharmacologiques. Les facteurs de croissance, les neurotrophines, les cytokines et les hormones sont également des régulateurs majeurs de la neurogenèse adulte (376). De plus, les analogues du glutamate pouvaient inhiber la naissance de nouvelles cellules, tandis que les antagonistes du glutamate améliorent la division cellulaire (377). En revanche, la neuro-inflammation réduit la production de nouveaux neurones. Au cours de notre étude, nous avons observé des effets néfastes en présence de BMAA et de glufosinate d'ammonium. Considérant que le SNC se construit à partir d'un nombre réduit de NSCs, il doit être noté que même de légers effets peuvent engendrer d'importantes conséquences plus tard dans la vie de l'individu. Les atteintes neuro-développementales, telle qu'une neuro-inflammation non (ou mal) prise en charge par les cellules immunocompétentes du SNC peuvent en effet engendrer de lourdes conséquences. Parmi elles, on peut citer l'apparition de troubles du spectre autistique (TSA), des épisodes schizophréniques, des troubles de la dépression, ou l'apparition de MDN plus tard dans la vie (378).

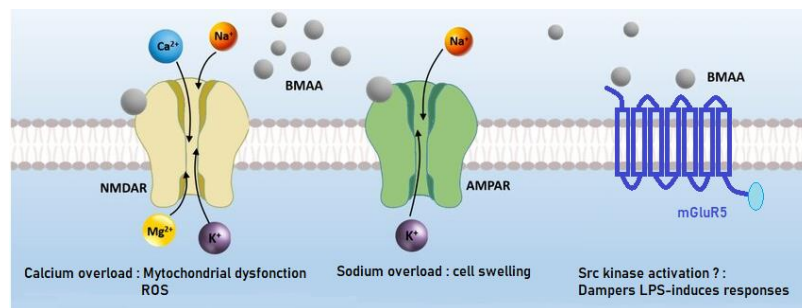


Figure 69 : Effets de la BMAA sur les récepteurs NMDA et AMPA. La BMAA agit comme agoniste des récepteurs au glutamate sur les cellules gliales et neuronales (modifié et complété d'après (349)).

Il existe d'autres preuves que les effets cellulaires de la BMAA peuvent être hérités post-mitotiques, ce qui suggère à nouveau qu'une exposition sub-excitotoxique unique peut être suffisante pour favoriser le développement d'une maladie neurologique sporadique (102). Les mécanismes épigénétiques sont essentiels dans différents processus biologiques et dans les interactions phénotype-environnement en réponse à différents facteurs de stress tels que les polluants. Ces mécanismes peuvent avoir des conséquences sur la plasticité phénotypique. En effet, la méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules souches neurales (379). Ces modifications deviennent hérissables par mitose et, dans certains cas, par méiose, peuvent donc être transférées aux générations suivantes via la lignée germinale (380). De façon intéressante, Pierozan et al. (17) ont démontré que la BMAA baissait les niveaux globaux de méthylation de l'ADN des cellules souches neurales ; à notre connaissance, cela n'a pas encore été investigué concernant le glyphosate et

le glufosinate d'ammonium. Ainsi, la nature persistante des effets induits par la BMAA, et l'absence de résilience observée *in vivo* chez les individus ayant été exposés *in utero* peuvent être liés à des altérations épigénétiques qui interfèrent avec la programmation des cellules souches neurales (Oummadi et al., *accepted*). L'approche combinée des DOHaD (*Developmental origin of health and disease*) et de l'épigénétique permet de mieux appréhender la manière dont des prédispositions épigénétiques *innées*, issues de nos parents, peuvent jouer un rôle décisif dans la survenue de cas pathologiques sporadiques.

Nos études concluent que les polluants, seuls ou en mélange, sont susceptibles de perturber l'homéostasie de la niche sous-ventriculaire SVZ puisqu'ils modifient les populations cellulaires et interagissent avec les cellules immunocompétentes de cellules issues de cette niche neurogénique. Néanmoins, nous devons prendre en considération qu'au sein de notre modèle de culture, nous ne représentons pas la barrière épendymaire, formée d'épendymocytes (cellules E) qui participent à la formation d'un microenvironnement neurogénique essentiel à la niche SVZ. A l'aide du Bleu Evans, nous nous sommes intéressés à évaluer la capacité des neurosphères à former une (sorte de) barrière cellulaire ; les résultats semblent aller dans ce sens puisque l'on observe une coloration du Blue Evans uniquement en périphérie de la neurosphère (Figure 69). Néanmoins pour pouvoir statuer quant à l'édification d'une couche protectrice extérieure des neurosphères nous devrions évaluer cela au FITC-Dextran et répéter les expérimentations effectuées au préalable en ajoutant les cellules E à notre culture primaire. Les cellules E sont en étroite relation avec les cellules B1 ; elles secrètent notamment la protéine Noggin, qui est un antagoniste des facteurs tels que *bone morphogen protein* (BMP) induisant la différenciation neuronale des cellules B1 par le blocage des facteurs de la gliogenèse (381).

D'autres voies de signalisation cellulaire pourraient être affectées par l'exposition aux polluant. La voie de signalisation Wnt est connue pour influencer de nombreux processus cellulaires ; la dérégulation de cette voie favorise par exemple le renouvellement des cellules souches cancéreuses, la prolifération et la différenciation cellulaire (382). Dans un contexte cellulaire sain et non-cancéreux, les voies de signalisation Wnt sont impliquées dans le neurodéveloppement, contrôlant la division cellulaire, la différenciation, la polarité, la migration et la synaptogenèse (383–385). Au sein de cellules de glioblastomes la BMAA uprégulerait la signalisation Wnt endogène ; ils ont en effet constaté que 4 μ M de BMAA augmentait la proportion de cellules « *neuroblast-like* » et augmentait l'expression de Myc, protéine clé de la voie Wnt. Cela appuie que la BMAA affecte les processus développementaux cruciaux (386).

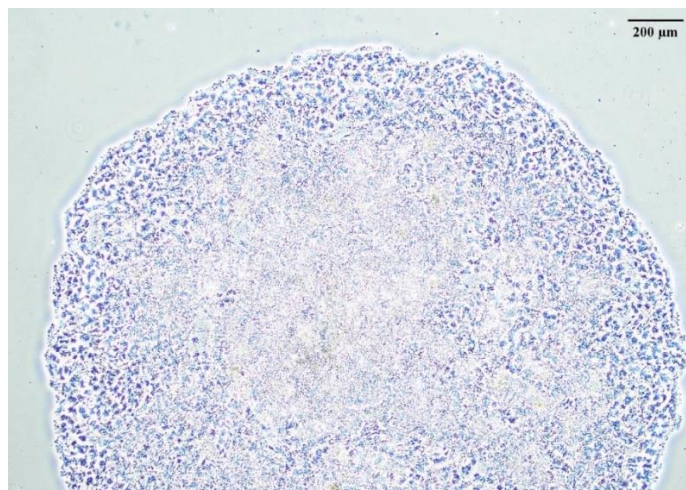


Figure 70 : marquage d'une neurosphère au Bleu Evans. On remarque que les cellules en bordure ont incorporé le marquage et non pas les cellules au cœur de la neurosphère.

III) Limites et intérêts du modèle *in vitro*

Nous devons également porter notre attention sur le fait que la reproduction de la pathologie humaine est délicate à mettre en place. En effet, les effets des xénobiotiques peuvent différer selon les espèces modèles, les doses/concentrations ainsi que les voies d'exposition. Il paraît important de souligner que la neurogenèse secondaire de l'être humain diffère de celles des modèles murins utilisés ici. En effet, la destination finale des neurones dérivés de SVZ n'est pas strictement identique entre les souris et les humains. Chez la souris, la SVZ donne principalement des neurones destinés aux bulbes olfactifs ainsi que dans la zone environnante ; chez l'homme les processus de migrations sont moins importants, à la fois dirigé vers les bulbes et le striatum de façon également amoindrie (Figure 70).

Puisque l'on s'intéresse aux effets des polluants anthropiques et naturels sur la neurogenèse secondaire, il serait pertinent de se pencher sur les modèles de cultures primaires issues d'organismes humains. Néanmoins, ces modèles requièrent l'utilisation de fœtus issus d'interruption volontaire de grossesse (IVG) et font naturellement l'objet de lourds processus éthiques. Il serait envisageable d'effectuer des co-cultures de cellules issues du commerce ; cela étant il faut garder à l'esprit que la modélisation des cellules primaires n'est souvent que partielle que ça soit dans l'expression de marqueurs de migration ou de production de médiateurs de l'inflammation. Une autre alternative serait l'utilisation des iPSC (*induced Pluripotent Stem Cells*) ; Ce sont des cellules souches pluripotentes générées à partir de cellules somatiques. De nouvelles lignées d'iPSC peuvent être générées en continu par reprogrammation de quatre « facteurs Yamanaka », dont le laboratoire est à l'origine de l'utilisation de ces modèles qui sont : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc au sein des cellules somatiques, ce qui permet une dédifférenciation en iPSC (387). Il faut néanmoins garder à l'esprit que certains facteurs utilisés pour

induire la pluripotence sont classifiés d'oncogènes : Klf4 ainsi que c-myc ; ces gènes entraînent la surexpression de gènes associés aux tumeurs au sein des iPSC (388). L'induction de la pluripotence sans ces deux oncogènes est possible mais est moins efficace (389)

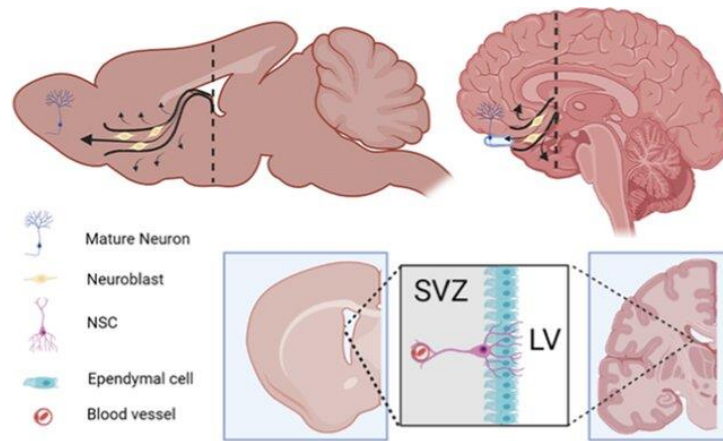


Figure 71 : Neurogenèse de la zone sous-ventriculaire (SVZ) dans le cerveau de la souris (à gauche) et de l'homme (à droite). Des sections sagittales (en haut) ou coronales (en bas) sont présentées pour illustrer comment les cellules souches neurales (NSCs) issues de la SVZ donnent naissance à des neuroblastes qui migrent le long du flux migratoire rostral (RMS) vers le bulbe olfactif (OB), puis se différencient en neurones matures (390)

En prenant en compte l'ensemble de ces paramètres, l'utilisation de NSCs en 2D et plus particulièrement en 3D, issues de souris nouveaux-nés, apparaît comme étant l'une des meilleures alternatives. Sous réserve de non-utilisation de sérums issus d'espèces animales, les modèles de culture sont sources d'intérêt pour remplacer l'utilisation des espèces animales à des fins scientifiques (règle des 3R). Les neurosphères, pouvant être conservées plusieurs mois, sont d'ores et déjà un outil pour étudier les MND, et notamment les tauopathies (391,392). Ce modèle n'est pas apte à remplacer les études *in vivo* mais il demeure plus relevant physiologiquement que les cultures en 2D, plus classiques (Figure 71).

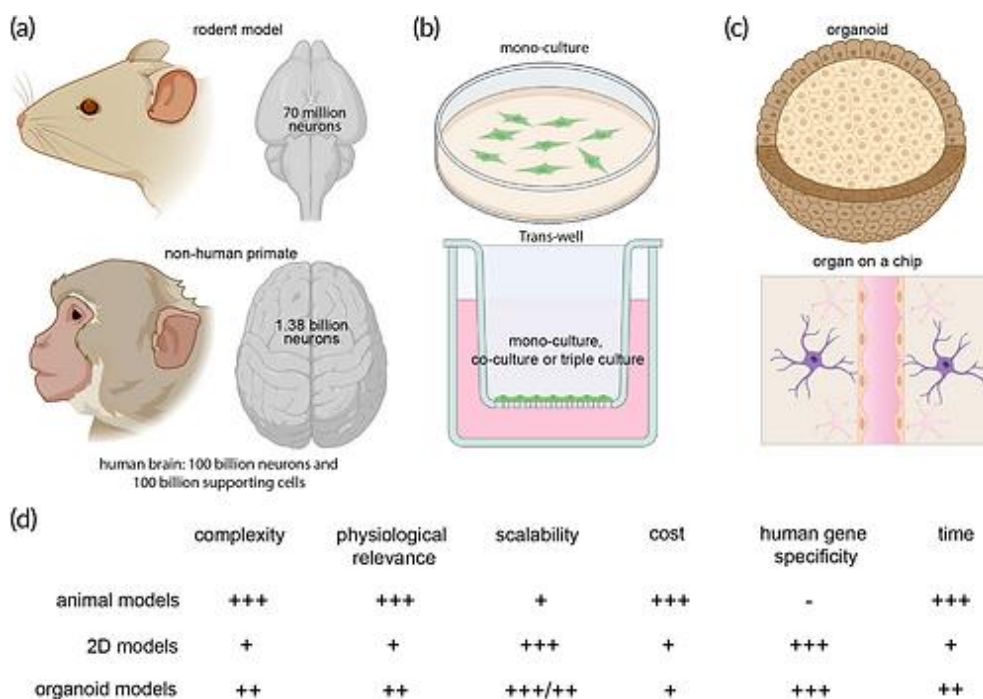


Figure 72 : Modélisation des MND. (a) Modèles animaux. Modèles animaux génétiquement modifiés qui expriment des gènes liés aux MND. Les rongeurs et les primates non humains sont les deux modèles animaux les plus populaires pour l'étude des MND. (b) Systèmes de modèles 2D. Monoculture sur une boîte de pétri, co-culture ou tri-culture de cellules cérébrales ou inserts trans-puits utilisant des cellules primaires de patients humains ou des cellules souches neurales (c) Modèles d'organoides cérébraux et d'organes cérébraux sur puce. (d) Comparaison et évaluation des modèles animaux, des modèles 2D et des modèles d'organoides. -, aucun ; +, faible ; ++, moyen ; +++, élevé (392).

Ces modèles 2D et 3D pourraient par exemple servir à la mise en place d'études d'Adverse Outcome Pathways, ou AOP (Figure 72). L'établissement de modèle AOP permet d'identifier la ou les séquences d'événements moléculaires et cellulaires clés nécessaires pour produire un effet toxique lorsqu'un organisme est exposé à une substance. La construction d'un AOP permet ainsi de mieux identifier les étapes d'un mécanisme de toxicité pouvant mener à la proposition de tests cellulaires ou biochimiques pour une toxicité ciblée.

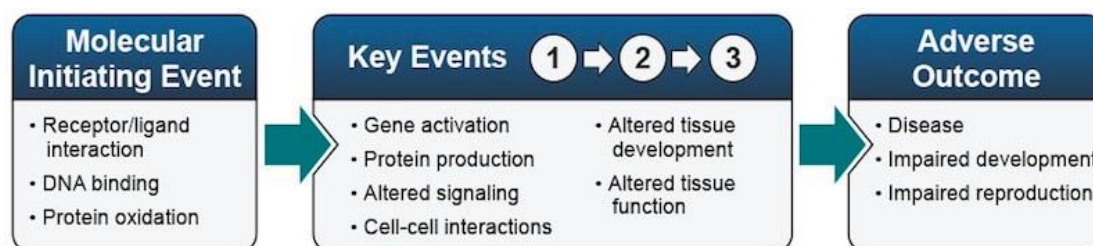


Figure 73 : Principe de l'étude d'AOP d'après le National Toxicology Program (U.S Department of Health and Human Services).

Conclusion

Les deux modèles de cultures que j'ai utilisés pendant cette thèse, à savoir les cultures en 2D (monocouche de cellules) et les organoïdes cérébraux, semblent être appropriés pour détecter les effets délétères pour la niche neurogénique SVZ et de façon plus large, le neurodéveloppement. Les cellules souches issues de ces modèles sont en mesure de s'auto-renouveler et de se différencier de façon proche à ce qui est observé *in vivo*. Selon les facteurs de croissance utilisés, elles ont la capacité de se différencier en cellules neurogliales. Ces modèles *in vitro* pourraient être envisagés avec des cellules humaines.

Mes résultats montrent que le glufosinate d'ammonium, la BMAA et de façon moindre le glyphosate interagissent avec les processus neuro-inflammatoires. Cependant, il reste difficile de statuer définitivement sur leur activité « pro- » ou « anti- » inflammatoire visiblement dépendante du contexte cellulaire et probablement des voies TLR impliquées. Par exemple, en l'absence de stimulation inflammatoire seule la BMAA montre un statut d'activation pro-inflammatoire. De plus, les molécules testées sont structurellement susceptibles d'interagir avec les systèmes glutamatergiques eux-mêmes impliqués dans le contrôle de la réponse neuro-inflammatoire. Néanmoins, mis en combinaison, les molécules ne montrent pas d'effet synergique. C'est ce que montrent nos résultats *in vitro* et c'est également ce qui a été observé *in vivo* (Oummadi et al., *accepted* ; Feat-Vetel et al., en préparation).

Ces données et celles de la littérature mettent en lumière la multitude de cibles possibles des molécules étudiées ici. Aussi, de nombreuses expérimentations restent à envisager pour identifier les cibles cellulaires et moléculaires des composés. Certaines questions demeurent en suspens. L'effet des molécules est-il lié aux contextes cellulaires et à ses complexes interactions ou plus particulièrement lié à la perturbation d'un type cellulaire particulier ? Quels seraient les effets des métabolites des molécules étudiées ? De plus, il semblerait que l'action de la BMAA ne soit pas spécifique d'un seul récepteur puisque l'utilisation d'antagonistes des NMDA, non-NMDA et des mGluR permettent d'inhiber les effets cellulaires (17). Est-ce que l'utilisation de concentrations inférieures à 100µM permettrait de caractériser des cibles plus spécifiques ?

L'avantage des études *in vitro* est qu'elles permettent d'apprécier ce qui se passe à l'échelle cellulaire. En effet, les processus neurodéveloppementaux sont une période critique et particulièrement sensible à l'exposition aux toxiques. Les résultats obtenus pendant cette thèse montrent que les composés, seuls ou en combinaison, peuvent interagir avec certains paramètres neuro-inflammatoires et perturber l'homéostasie des cellules issues de la SVZ. Le glyphosate est la molécule dont les effets sont, aux paramètres étudiés, les plus discrets. Ces données sont à compléter avec des études *in vivo* pour déterminer si l'organisme est en mesure d'être résilient face à ces perturbations de l'homéostasie cellulaire ou si cela favorise l'apparition de neuropathologies. L'ensemble des approches *in vitro*

développées au sein de cette thèse ont révélés des effets complexes, parfois discrets, soulignant la difficulté d'une caractérisation d'un effet « toxique » du fait de la diversité des molécules, des concentrations et des combinaisons possibles. Cela nous amène à nous questionner sur les facteurs environnementaux auxquels nous sommes exposés, actuels et à venir, et leurs potentiels impacts sur le neurodéveloppement, en particulier sur la neurogenèse secondaire et donc sur la plasticité cérébrale pouvant favoriser l'apparition des troubles neurologiques. Par ailleurs, mes évaluations ont été réalisés chez la souris et concernent les mammifères. Nous pourrions également nous questionner sur les effets des polluants sur les autres vertébrés en prenant en compte le potentiel de bioaccumulation des composés. Cela nous permettrait d'identifier les pressions de sélection ainsi que les mécanismes de défenses, évolutifs, sous-jacents.

Références

1. Harley CDG, Randall Hughes A, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, et al. The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol Lett*. 2006 Feb;9(2):228–41.
2. Erdner DL, Dyble J, Parsons ML, Stevens RC, Hubbard KA, Wrabel ML, et al. Centers for Oceans and Human Health: a unified approach to the challenge of harmful algal blooms. *Environmental Health*. 2008;7(Suppl 2):S2.
3. Hallegraeff GM. OCEAN CLIMATE CHANGE, PHYTOPLANKTON COMMUNITY RESPONSES, AND HARMFUL ALGAL BLOOMS: A FORMIDABLE PREDICTIVE CHALLENGE. *J Phycol*. 2010 Apr;46(2):220–35.
4. Wells ML, Trainer VL, Smayda TJ, Karlson BSO, Trick CG, Kudela RM, et al. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae*. 2015 Nov;49:68–93.
5. Nixon SW. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*. 1995 Feb 20;41(1):199–219.
6. Van Dolah FM. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ Health Perspect*. 2000 Mar;108(suppl 1):133–41.
7. Wang J, Hu X, Chen J, Wang T, Huang X, Chen G. The Extraction of β -Carotene from Microalgae for Testing Their Health Benefits. *Foods*. 2022 Feb 10;11(4).
8. Barkia I, Saari N, Manning SR. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Mar Drugs*. 2019 May 24;17(5):304.
9. Ferrazzano GF, Papa C, Pollio A, Ingenito A, Sangianantoni G, Cantile T. Cyanobacteria and Microalgae as Sources of Functional Foods to Improve Human General and Oral Health. *Molecules*. 2020 Nov 6;25(21).
10. Sorrenti V, Castagna DA, Fortinguerra S, Buriani A, Scapagnini G, Willcox DC. Spirulina Microalgae and Brain Health: A Scoping Review of Experimental and Clinical Evidence. *Mar Drugs*. 2021 May 22;19(6):293.
11. Roy-Lachapelle A, Sollicec M, Bouchard M, Sauvé S. Detection of Cyanotoxins in Algae Dietary Supplements. *Toxins (Basel)*. 2017 Feb 25;9(3):76.
12. Smith QR, Nagura H, Takada Y, Duncan MW. Facilitated transport of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 1992 Apr;58(4):1330–7.
13. Weiss JH, Koh J young, Choi DW. Neurotoxicity of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and β -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res*. 1989 Sep;497(1):64–71.
14. Ross SM, Spencer PS. Specific antagonism of behavioral action of ?uncommon? amino acids linked to motor-system diseases. *Synapse*. 1987;1(3):248–53.
15. Liu XQ, Rush T, Ciske J, Lobner D. Selective death of cholinergic neurons induced by beta-methylamino-L-alanine. *Neuroreport*. 2010 Jan 6;21(1):55–8.
16. Lobner D, Piana PMT, Salous AK, Peoples RW. β -N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis*. 2007 Feb;25(2):360–6.

17. Pierozan P, Cattani D, Karlsson O. Hippocampal neural stem cells are more susceptible to the neurotoxin BMAA than primary neurons: effects on apoptosis, cellular differentiation, neurite outgrowth, and DNA methylation. *Cell Death Dis.* 2020 Oct 24;11(10):910.
18. Delcourt N, Claudepierre T, Maignien T, Arnich N, Mattei C. Cellular and Molecular Aspects of the β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) Mode of Action within the Neurodegenerative Pathway: Facts and Controversy. *Toxins (Basel).* 2017 Dec 22;10(1):6.
19. Hanus M, Parada-Venegas D, Landskron G, Wielandt AM, Hurtado C, Alvarez K, et al. Immune System, Microbiota, and Microbial Metabolites: The Unresolved Triad in Colorectal Cancer Microenvironment. *Front Immunol.* 2021 Mar 26;12.
20. Barbeau A, Dallaire L, Buu NT, Poirier J, Rucinska E. Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in rana pipiens. *Life Sci.* 1985 Oct;37(16):1529–38.
21. Vermeulen R, Schymanski EL, Barabási AL, Miller GW. The exposome and health: Where chemistry meets biology. *Science (1979).* 2020 Jan 24;367(6476):392–6.
22. Delwiche CF. Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *Am Nat.* 1999 Oct;154(S4):S164–77.
23. Schopf JW, Kudryavtsev AB. Biogenicity of Earth's earliest fossils: A resolution of the controversy. *Gondwana Research.* 2012 Nov;22(3–4):761–71.
24. Paerl HW, Huisman J. Climate. Blooms Like It Hot. *Science (1979).* 2008 Apr 4;320(5872):57–8.
25. Paerl HW, Otten TG. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microb Ecol.* 2013 May 13;65(4):995–1010.
26. Vijayakumar S, Menakha M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. *J Acute Med.* 2015 Mar;5(1):15–23.
27. Metcalf JS, Codd GA. Cyanotoxins. In: *Ecology of Cyanobacteria II.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 651–75.
28. Testai E, Buratti FM, Funari E, Manganelli M, Vichi S, Arnich N, et al. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. *EFSA Supporting Publications.* 2016 Feb;13(2).
29. Cox PA, Banack SA, Murch SJ, Rasmussen U, Tien G, Bidigare RR, et al. Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005 Apr 5;102(14):5074–8.
30. Spencer PS. Guam ALS/Parkinsonism-Dementia: A Long-Latency Neurotoxic Disorder Caused by “Slow Toxin(s)” in Food? *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques.* 1987 Aug 5;14(S3):347–57.
31. Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, et al. Guam Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-Dementia Linked to a Plant Excitant Neurotoxin. *Science (1979).* 1987 Jul 31;237(4814):517–22.
32. Tymm FJM, Bishop SL, Murch SJ. A Single Laboratory Validation for the Analysis of Underivatized β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA). *Neurotox Res.* 2021 Feb 11;39(1):49–71.

33. GROTH I, SCHUMANN P, WEISS N, MARTIN K, RAINEY FA. *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a New Genus of Actinomycetes with Diaminobutyric Acid in the Cell Wall. *Int J Syst Bacteriol.* 1996 Jan 1;46(1):234–9.
34. Rosén J, Hellenäs KE. Determination of the neurotoxin BMAA (β -N-methylamino-l-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst.* 2008;133(12):1785.
35. Banack SA, Metcalf JS, Spáčil Z, Downing TG, Downing S, Long A, et al. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) from other diamino acids. *Toxicon.* 2011 Apr;57(5):730–8.
36. Banack SA, Metcalf JS, Jiang L, Craighead D, Ilag LL, Cox PA. Cyanobacteria Produce N-(2-Aminoethyl)Glycine, a Backbone for Peptide Nucleic Acids Which May Have Been the First Genetic Molecules for Life on Earth. *PLoS One.* 2012 Nov 7;7(11):e49043.
37. Jiang L, Aigret B, De Borggraeve WM, Spacil Z, Ilag LL. Selective LC-MS/MS method for the identification of BMAA from its isomers in biological samples. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Jun 14;403(6):1719–30.
38. Huang J, Xiong N, Chen C, Xiong J, Jia M, Zhang Z, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: activity inhibition and protein overexpression in rotenone models for Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2011 Sep;192:598–608.
39. Zhan C, Liu G, Li J, Li G, Li T, Zhao H, et al. Rotenone and 3-bromopyruvate toxicity impacts electrical and structural cardiac remodeling in rats. *Toxicol Lett.* 2020 Jan;318:57–64.
40. Kruger T, Oelmuller L, Luckas B. The origin of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA): Cycads and/or cyanobacteria? *J Endocytobiosis Cell Res.* 2012;22:29–36.
41. Brenner ED, Stevenson DW, McCombie RW, Katari MS, Rudd SA, Mayer KF, et al. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. *Genome Biol.* 2003;4(12):R78.
42. BANACK SA, COX PA. Distribution of the neurotoxic nonprotein amino acid BMAA in *Cycas micronesica*. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 2003 Oct;143(2):165–8.
43. Marler TE, Snyder LR, Shaw CA. *Cycas micronesica* (Cycadales) plants devoid of endophytic cyanobacteria increase in β -methylamino-l-alanine. *Toxicon.* 2010 Sep;56(4):563–8.
44. Snyder LR, Marler TE. Rethinking cycad metabolite research. *Commun Integr Biol.* 2011 Jan 5;4(1):86–8.
45. Spáčil Z, Eriksson J, Jonasson S, Rasmussen U, Ilag LL, Bergman B. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst.* 2010;135(1):127–32.
46. Fan H, Qiu J, Fan L, Li A. Effects of growth conditions on the production of neurotoxin 2,4-diaminobutyric acid (DAB) in *Microcystis aeruginosa* and its universal presence in diverse cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Environmental Science and Pollution Research.* 2015 Apr 30;22(8):5943–51.
47. McCarron P, Logan AC, Giddings SD, Quilliam MA. Analysis of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in spirulina-containing supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Aquat Biosyst.* 2014 Dec 8;10(1):5.

48. Krüger T, Mönch B, Oppenhäuser S, Luckas B. LC–MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. *Toxicon*. 2010 Feb;55(2–3):547–57.
49. Al-Sammak M, Hoagland K, Cassada D, Snow D. Co-occurrence of the Cyanotoxins BMAA, DABA and Anatoxin-a in Nebraska Reservoirs, Fish, and Aquatic Plants. *Toxins (Basel)*. 2014 Jan 28;6(2):488–508.
50. Jonasson S, Eriksson J, Berntzon L, Spáčil Z, Ilag LL, Ronnevi LO, et al. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 May 18;107(20):9252–7.
51. Watanabe MF, Oishi S. Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions. *Appl Environ Microbiol*. 1985 May;49(5):1342–4.
52. Downing TG, Meyer C, Gehringer MM, van de Venter M. Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environ Toxicol*. 2005 Jun;20(3):257–62.
53. van der Westhuizen AJ, Eloff JN. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*. 1985 Jan;163(1):55–9.
54. Hu C, Lee Z, Ma R, Yu K, Li D, Shang S. Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) observations of cyanobacteria blooms in Taihu Lake, China. *J Geophys Res*. 2010 Apr 1;115(C4):C04002.
55. Lage S, Burian A, Rasmussen U, Costa PR, Annadotter H, Godhe A, et al. BMAA extraction of cyanobacteria samples: which method to choose? *Environmental Science and Pollution Research*. 2016 Jan 26;23(1):338–50.
56. Kubo T, Kato N, Hosoya K, Kaya K. Effective determination method for a cyanobacterial neurotoxin, β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon*. 2008 Jun;51(7):1264–8.
57. Faassen EJ, Gillissen F, Lüring M. A Comparative Study on Three Analytical Methods for the Determination of the Neurotoxin BMAA in Cyanobacteria. *PLoS One*. 2012 May 3;7(5):e36667.
58. Berntzon L, Erasmie S, Celepli N, Eriksson J, Rasmussen U, Bergman B. BMAA Inhibits Nitrogen Fixation in the Cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 7120. *Mar Drugs*. 2013 Aug 21;11(8):3091–108.
59. Jiang L, Johnston E, Åberg KM, Nilsson U, Ilag LL. Strategy for quantifying trace levels of BMAA in cyanobacteria by LC/MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2013 Feb 21;405(4):1283–92.
60. Violi JP, Facey JA, Mitrovic SM, Colville A, Rodgers KJ. Production of β -methylamino-L-alanine (BMAA) and Its Isomers by Freshwater Diatoms. *Toxins (Basel)*. 2019 Sep 2;11(9):512.
61. Réveillon D, Abadie E, Séchet V, Masseret E, Hess P, Amzil Z. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Mar Environ Res*. 2015 Sep;110:8–18.
62. Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Aug 17;101(33):12228–31.

63. Rao DVS, Quilliam MA, Pocklington R. Domoic Acid—A Neurotoxic Amino Acid Produced by the Marine Diatom *Nitzschia pungens* in Culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1988 Dec 1;45(12):2076–9.
64. Jiang L, Eriksson J, Lage S, Jonasson S, Shams S, Mehine M, et al. Diatoms: A Novel Source for the Neurotoxin BMAA in Aquatic Environments. *PLoS One*. 2014 Jan 2;9(1):e84578.
65. Bustillos-Guzmán JJ, Band-Schmidt CJ, López-Cortés DJ, Hernández-Sandoval FE, Núñez-Vázquez E, Gárate-Lizárraga I. Grazing of the dinoflagellate *Noctiluca scintillans* on the paralytic toxin-producing dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*: Does grazing eliminate cells during a bloom? *Cienc Mar*. 2013 Sep 1;39(3):291–302.
66. Qi L, Hu C, Liu J, Ma R, Zhang Y, Zhang S. *Noctiluca* blooms in the East China Sea bounded by ocean fronts. *Harmful Algae*. 2022 Feb;112:102172.
67. Lage S, Costa PR, Moita T, Eriksson J, Rasmussen U, Rydberg SJ. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquatic Toxicology*. 2014 Jul;152:131–8.
68. Réveillon D, Séchet V, Hess P, Amzil Z. Production of BMAA and DAB by diatoms (*Phaeodactylum tricornutum* , *Chaetoceros* sp., *Chaetoceros calcitrans* and, *Thalassiosira pseudonana*) and bacteria isolated from a diatom culture. *Harmful Algae*. 2016 Sep;58:45–50.
69. Vega A. α -Amino- β -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry*. 1967 May;6(5):759–62.
70. Glover WB, Mash DC, Murch SJ. The natural non-protein amino acid N- β -methylamino-L-alanine (BMAA) is incorporated into protein during synthesis. *Amino Acids*. 2014 Nov 6;46(11):2553–9.
71. Brenner ED, Stevenson DW, McCombie RW, Katari MS, Rudd SA, Mayer KF, et al. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most primitive living seed plant. *Genome Biol*. 2003;4(12):R78.
72. Nunn PB, Codd GA. Metabolic solutions to the biosynthesis of some diaminomono-carboxylic acids in nature: Formation in cyanobacteria of the neurotoxins 3-N-methyl-2,3-diaminopropanoic acid (BMAA) and 2,4-diaminobutanoic acid (2,4-DAB). *Phytochemistry*. 2017 Dec;144:253–70.
73. Mantas MJQ, Nunn PB, Codd GA, Barker D. Genomic insights into the biosynthesis and physiology of the cyanobacterial neurotoxin 3-N-methyl-2,3-diaminopropanoic acid (BMAA). *Phytochemistry*. 2022 Aug;200:113198.
74. Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, et al. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana* : Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* (1979). 2004 Oct;306(5693):79–86.
75. Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, et al. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*. 2008 Nov 15;456(7219):239–44.
76. Downing S, Banack SA, Metcalf JS, Cox PA, Downing TG. Nitrogen starvation of cyanobacteria results in the production of β -N-methylamino-L-alanine. *Toxicon*. 2011 Aug;58(2):187–94.
77. Bidle KD. Programmed Cell Death in Unicellular Phytoplankton. *Current Biology*. 2016 Jul;26(13):R594–607.

78. Berman-Frank I, Bidle KD, Haramaty L, Falkowski PG. The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway. *Limnol Oceanogr.* 2004 Jul;49(4):997–1005.
79. Popova AA, Rasmussen U, Semashko TA, Govorun VM, Koksharova OA. Stress effects of cyanotoxin β -methylamino-L-alanine (BMAA) on cyanobacterial heterocyst formation and functionality. *Environ Microbiol Rep.* 2018 Jun;10(3):369–77.
80. Ning SB, Guo HL, Wang L, Song YC. Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena*. *J Appl Microbiol.* 2002 Jul;93(1):15–28.
81. Haraldsson M, Gerphagnon M, Bazin P, Colombet J, Tecchio S, Sime-Ngando T, et al. Microbial parasites make cyanobacteria blooms less of a trophic dead end than commonly assumed. *ISME J.* 2018 Apr 7;12(4):1008–20.
82. Monteiro M, Costa M, Moreira C, Vasconcelos VM, Baptista MS. Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in in situ blooms. *J Appl Phycol.* 2017 Apr 14;29(2):879–88.
83. Zhang Y, Whalen JK. Production of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine may be triggered by agricultural nutrients: An emerging public health issue. *Water Res.* 2020 Mar;170:115335.
84. Whitton BA, Potts M. Introduction to the Cyanobacteria. In: *Ecology of Cyanobacteria II*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012. p. 1–13.
85. Zhao CS, Shao NF, Yang ST, Ren H, Ge YR, Feng P, et al. Predicting cyanobacteria bloom occurrence in lakes and reservoirs before blooms occur. *Science of The Total Environment.* 2019 Jun;670:837–48.
86. Hecht JS, Zia A, Clemins PJ, Schroth AW, Winter JM, Oikonomou PD, et al. Modeling the sensitivity of cyanobacteria blooms to plausible changes in precipitation and air temperature variability. *Science of The Total Environment.* 2022 Mar;812:151586.
87. Christensen VG, Khan E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. *Science of The Total Environment.* 2020 Sep;736:139515.
88. Celikkol S, Fortin N, Tromas N, Andriananjamanantsoa H, Greer CW. Bioavailable Nutrients (N and P) and Precipitation Patterns Drive Cyanobacterial Blooms in Missisquoi Bay, Lake Champlain. *Microorganisms.* 2021 Oct 4;9(10):2097.
89. Monteiro M, Costa M, Moreira C, Vasconcelos VM, Baptista MS. Screening of BMAA-producing cyanobacteria in cultured isolates and in in situ blooms. *J Appl Phycol.* 2017 Apr 14;29(2):879–88.
90. Fait A, Fromm H, Walter D, Galili G, Fernie AR. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci.* 2008 Jan;13(1):14–9.
91. Scholz SS, Malabarba J, Reichelt M, Heyer M, Ludewig F, Mithöfer A. Evidence for GABA-Induced Systemic GABA Accumulation in Arabidopsis upon Wounding. *Front Plant Sci.* 2017 Mar 22;8.

92. Bar-Zeev E, Avishay I, Bidle KD, Berman-Frank I. Programmed cell death in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* mediates carbon and nitrogen export. *ISME J.* 2013 Dec 25;7(12):2340–8.
93. Asplund-Samuelsson J, Sundh J, Dupont CL, Allen AE, McCrow JP, Celepli NA, et al. Diversity and Expression of Bacterial Metacaspases in an Aquatic Ecosystem. *Front Microbiol.* 2016 Jul 6;7.
94. Brenner ED, Martinez-Barboza N, Clark AP, Liang QS, Stevenson DW, Coruzzi GM. Arabidopsis Mutants Resistant to S(+)- β -Methyl- α , β -Diaminopropionic Acid, a Cycad-Derived Glutamate Receptor Agonist. *Plant Physiol.* 2000 Dec 1;124(4):1615–24.
95. Chen Z, Ren L, Shao Q, Shi D, Ru B. Expression of Mammalian Metallothionein-I Gene in Cyanobacteria to Enhance Heavy Metal Resistance. *Mar Pollut Bull.* 1999 Jan;39(1–12):155–8.
96. Downing S, Esterhuizen-Londt M, Grant Downing T. β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) metabolism in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015 Oct;120:88–92.
97. Kim SY, Rasmussen U, Rydberg S. Effect and function of β -N-methylamino-L-alanine in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Science of The Total Environment.* 2022 Jul;830:154778.
98. Kim SY, Hedberg P, Winder M, Rydberg S. Evidence of 2,4-diaminobutyric acid (DAB) production as a defense mechanism in diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Aquatic Toxicology.* 2022 Aug;249:106210.
99. Muñoz-Sáez E, de Munck García E, Arahuetes Portero RM, Martínez A, Solas Alados MT, Miguel BG. Analysis of β -N-methylamino- L -alanine (L-BMAA) neurotoxicity in rat cerebellum. *Neurotoxicology.* 2015 May;48:192–205.
100. Dunlop RA, Cox PA, Banack SA, Rodgers KJ. The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of L-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS One.* 2013 Sep 25;8(9):e75376.
101. van Onselen R, Scott LL, Downing TG. Evaluating amino acids as protectants against β -N-methylamino-L-alanine-induced developmental neurotoxicity in a rat model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020 Sep;403:115140.
102. Pierozan P, Karlsson O. Mitotically heritable effects of BMAA on striatal neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.* 2019 Jul 17;10(7):478.
103. Pierozan P, Piras E, Brittebo E, Karlsson O. The cyanobacterial neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) targets the olfactory bulb region. *Arch Toxicol.* 2020 Aug 20;94(8):2799–808.
104. Aronica E, Nicoletti F, Condorelli DF, Balazs R. Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res.* 1993 May;18(5):605–12.
105. Karlsson O, Lindquist NG, Brittebo EB, Roman E. Selective Brain Uptake and Behavioral Effects of the Cyanobacterial Toxin BMAA (β -N-Methylamino-L-alanine) following Neonatal Administration to Rodents. *Toxicological Sciences.* 2009 Jun;109(2):286–95.
106. Andersson M, Karlsson O, Banack SA, Brandt I. Transfer of developmental neurotoxin β - N -methylamino- L -alanine (BMAA) via milk to nursed offspring: Studies by mass spectrometry and image analysis. *Toxicol Lett.* 2016 Sep;258:108–14.

107. Engskog MKR, Karlsson O, Haglöf J, Elmsjö A, Brittebo E, Arvidsson T, et al. The cyanobacterial amino acid β -N-methylamino-L-alanine perturbs the intermediary metabolism in neonatal rats. *Toxicology*. 2013 Oct;312:6–11.
108. Courtier A, Potheret D, Giannoni P. Environmental bacteria as triggers to brain disease: Possible mechanisms of toxicity and associated human risk. *Life Sci*. 2022 Sep;304:120689.
109. Perry TL, Bergeron C, Biro AJ, Hansen S. β -N-Methylamino-L-alanine. *J Neurol Sci*. 1989 Dec;94(1–3):173–80.
110. O’Neal RM, Chen CH, Reynolds CS, Meghal SK, Koeppe RE. The ‘neurotoxicity’ of β -2,4-diaminobutyric acid. *Biochemical Journal*. 1968 Feb 1;106(3):699–706.
111. Smith SE, Meldrum BS. Receptor site specificity for the acute effects of β -N-methylamino-alanine in mice. *Eur J Pharmacol*. 1990 Oct;187(1):131–4.
112. SEAWRIGHT AA, BROWN AW, NOLAN CC, CAVANAGH JB. Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L- β -methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1990 Apr;16(2):153–69.
113. Rakoncay Z, Matsuoka Y, Giacobini E. Effects of B-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat. *J Neurosci Res*. 1991 May;29(1):121–6.
114. Yutaka Matsuoka, Zoltan R, Ezio G, Dean N. L- β -methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993 Mar;44(3):727–34.
115. Karlsson O, Roman E, Berg AL, Brittebo EB. Early hippocampal cell death, and late learning and memory deficits in rats exposed to the environmental toxin BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) during the neonatal period. *Behavioural Brain Research*. 2011 Jun;219(2):310–20.
116. Hanrieder J, Gerber L, Persson Sandelius Å, Brittebo EB, Ewing AG, Karlsson O. High Resolution Metabolite Imaging in the Hippocampus Following Neonatal Exposure to the Environmental Toxin BMAA Using ToF-SIMS. *ACS Chem Neurosci*. 2014 Jul 16;5(7):568–75.
117. de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Martínez A, Arahuetes RM. Morphometric and neurochemical alterations found in L-BMAA treated rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 May;39(3):1232–45.
118. Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary β -methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006 Jun;84(2):294–9.
119. Buenz EJ, Howe CL. Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology*. 2007 May;28(3):702–4.
120. Tian KW, Jiang H, Wang BB, Zhang F, Han S. Intravenous injection of β -BMAA induces a rat model with comprehensive characteristics of amyotrophic lateral sclerosis/Parkinson–dementia complex. *Toxicol Res (Camb)*. 2016;5(1):79–96.
121. Scott L, Downing T. A Single Neonatal Exposure to BMAA in a Rat Model Produces Neuropathology Consistent with Neurodegenerative Diseases. *Toxins (Basel)*. 2017 Dec 29;10(1):22.

122. Waidyanatha S, Ryan K, Sanders JM, McDonald JD, Wegerski CJ, Doyle-Eisle M, et al. Disposition of β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA), a neurotoxin, in rodents following a single or repeated oral exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018 Jan;339:151–60.
123. Pierozan P, Andersson M, Brandt I, Karlsson O. The environmental neurotoxin β -N-methylamino-L-alanine inhibits melatonin synthesis in primary pinealocytes and a rat model. *J Pineal Res*. 2018 Aug;65(1):e12488.
124. Scott L, Downing T. Dose-Dependent Adult Neurodegeneration in a Rat Model After Neonatal Exposure to β -N-Methylamino-L-Alanine. *Neurotox Res*. 2019 Apr 21;35(3):711–23.
125. Pablo J, Banack SA, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley WG, et al. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 2009 Oct;120(4):216–25.
126. Arif M, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Garruto RM, Iqbal K. Tau pathology involves protein phosphatase 2A in Parkinsonism-dementia of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Jan 21;111(3):1144–9.
127. Banack SA, Murch SJ. Multiple neurotoxic items in the Chamorro diet link BMAA with ALS/PDC. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2009 Jan 25;10(sup2):34–40.
128. Berntzon L, Ronnevi LO, Bergman B, Eriksson J. Detection of BMAA in the human central nervous system. *Neuroscience*. 2015 Apr;292:137–47.
129. Meneely JP, Chevallier OP, Graham S, Greer B, Green BD, Elliott CT. β -methylamino-L-alanine (BMAA) is not found in the brains of patients with confirmed Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2016 Nov 8;6(1):36363.
130. Downing S, Scott L, Zguna N, Downing T. Human Scalp Hair as an Indicator of Exposure to the Environmental Toxin β -N-Methylamino-L-alanine. *Toxins (Basel)*. 2017 Dec 27;10(1):14.
131. Chia R, Chiò A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2018 Jan;17(1):94–102.
132. Calvo A, Canosa A, Bertuzzo D, Cugnasco P, Solero L, Clerico M, et al. Influence of cigarette smoking on ALS outcome: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Nov;87(11):1229–33.
133. Sánchez-Santed F, Colomina MT, Herrero Hernández E. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*. 2016 Jan;74:417–26.
134. Lagrange E, Vernoux JP, Reis J, Palmer V, Camu W, Spencer PS. An amyotrophic lateral sclerosis hot spot in the French Alps associated with genotoxic fungi. *J Neurol Sci*. 2021 Aug;427:117558.
135. Cox PA, Banack SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Nov 11;100(23):13380–3.
136. Esterhuizen-Londt M, Pflugmacher S, Downing TG. The effect of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon*. 2011 Apr;57(5):803–10.
137. Weiss JH, Choi DW. Beta- N -Methylamino-L-Alanine Neurotoxicity: Requirement for Bicarbonate as a Cofactor. *Science (1979)*. 1988 Aug 19;241(4868):973–5.

138. Jie C, Treyer V, Schibli R, Mu L. Tauvid™: The First FDA-Approved PET Tracer for Imaging Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*. 2021 Jan 30;14(2):110.
139. Liu X, Rush T, Zapata J, Lobner D. β -N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc⁻. *Exp Neurol*. 2009 Jun;217(2):429–33.
140. de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Ojeda I, Martínez A, et al. β -N-methylamino-L-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013 Sep;36(2):243–55.
141. Muñoz-Saez E, de Munck E, Arahuetes RM, Solas MT, Martínez AM, Miguel BG. β -N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma. *J Toxicol Sci*. 2013;38(3):425–30.
142. de Pedro N, Cantizani J, Ortiz-López FJ, González-Menéndez V, Cautain B, Rodríguez L, et al. Protective effects of isolecanoric acid on neurodegenerative in vitro models. *Neuropharmacology*. 2016 Feb;101:538–48.
143. Buratti E, Baralle FE. The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol*. 2010 Jul 27;7(4):420–9.
144. Borroni B, Bonvicini C, Alberici A, Buratti E, Agosti C, Archetti S, et al. Mutation within *TARDBP* leads to Frontotemporal Dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat*. 2009 Nov;30(11):E974–83.
145. Yin HZ, Yu S, Hsu CI, Liu J, Acab A, Wu R, et al. Intrathecal infusion of BMAA induces selective motor neuron damage and astrogliosis in the ventral horn of the spinal cord. *Exp Neurol*. 2014 Nov;261:1–9.
146. Manolidi K, Triantis TM, Kaloudis T, Hiskia A. Neurotoxin BMAA and its isomeric amino acids in cyanobacteria and cyanobacteria-based food supplements. *J Hazard Mater*. 2019 Mar;365:346–65.
147. Thany SH, Reynier P, Lenaers G. Neurotoxicité des pesticides. *médecine/sciences*. 2013 Mar 27;29(3):273–8.
148. F.M. Corrigan CLWRF. ORGANOCHLORINE INSECTICIDES IN SUBSTANTIA NIGRA IN PARKINSON'S DISEASE. *J Toxicol Environ Health A*. 2000 Feb 25;59(4):229–34.
149. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: Selective Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons Caused by the Herbicide Paraquat. *Neurobiol Dis*. 2002 Jul;10(2):119–27.
150. Cha Y, Kim H, Lee Y, Choi E, Kim H, Kim O, et al. The relationship between serum ammonia level and neurologic complications in patients with acute glufosinate ammonium poisoning: A prospective observational study. *Hum Exp Toxicol*. 2018 Jun 25;37(6):571–9.
151. Takano HK, Dayan FE. Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Manag Sci*. 2020 Dec 28;76(12):3911–25.
152. Baune P. Alimentation et cancer : interactions entre génétique et xénobiotiques. *Gastroenterol Clin Bio*. 2001;

153. Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Vermeulen R, Waidyanatha S, Zhang L, et al. Evidence That Humans Metabolize Benzene via Two Pathways. *Environ Health Perspect.* 2009 Jun;117(6):946–52.
154. Valentine JL, Lee SST, Seaton MJ, Asgharian B, Farris G, Corton JC, et al. Reduction of benzene metabolism and toxicity in mice that lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996 Nov;141(1):205–13.
155. Drzeżdżon J, Jacewicz D, Chmurzyński L. The impact of environmental contamination on the generation of reactive oxygen and nitrogen species – Consequences for plants and humans. *Environ Int.* 2018 Oct;119:133–51.
156. Costas-Ferreira C, Durán R, Faro LRF. Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 21;23(9):4605.
157. Davoren MJ, Schiestl RH. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis.* 2018 Oct 8;39(10):1207–15.
158. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur.* 2016 Dec 2;28(1):3.
159. van Bruggen AH, Gamliel A, Finckh MR. Plant disease management in organic farming systems. *Pest Manag Sci.* 2016 Jan;72(1):30–44.
160. Villarreal-Chiu JF, Acosta-Cortés AG, Kumar S, Kaushik G. Biological Limitations on Glyphosate Biodegradation. In: *Green Technologies and Environmental Sustainability.* Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 179–201.
161. Hayes AW, Loomis TA. *Loomis’s essentials of toxicology.* Elsevier. Elsevier. 1996;
162. Mesnage R, Arno M, Costanzo M, Malatesta M, Séralini GE, Antoniou MN. Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environmental Health.* 2015 Dec 25;14(1):70.
163. Mesnage R, Renney G, Séralini GE, Ward M, Antoniou MN. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Sci Rep.* 2017 Jan 9;7(1):39328.
164. Barbosa M, Valentão P, Andrade P. Bioactive Compounds from Macroalgae in the New Millennium: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Mar Drugs.* 2014 Sep 25;12(9):4934–72.
165. Eriguchi M, Iida K, Ikeda S, Osoegawa M, Nishioka K, Hattori N, et al. Parkinsonism Relating to Intoxication with Glyphosate. *Internal Medicine.* 2019 Jul 1;58(13):1935–8.
166. Kwiatkowska M, Reszka E, Woźniak K, Jabłońska E, Michałowicz J, Bukowska B. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology.* 2017 Jul;105:93–8.
167. Davoren MJ, Schiestl RH. Glyphosate-based herbicides and cancer risk: a post-IARC decision review of potential mechanisms, policy and avenues of research. *Carcinogenesis.* 2018 Oct 8;39(10):1207–15.

168. Gao X, Cui H, Zhu L, Shi T, Shen S. Multi-source data-based 3D digital preservation of largescale ancient chinese architecture: A case report. *Virtual Reality & Intelligent Hardware*. 2019 Oct;1(5):525–41.
169. Robinson C. Teratogenic Effects of Glyphosate-Based Herbicides: Divergence of Regulatory Decisions from Scientific Evidence. *J Environ Anal Toxicol*. 2012;01(S4).
170. Masood MI, Naseem M, Warda SA, Tapia-Laliena MÁ, Rehman H ur, Nasim MJ, et al. Environment permissible concentrations of glyphosate in drinking water can influence the fate of neural stem cells from the subventricular zone of the postnatal mouse. *Environmental Pollution*. 2021 Feb;270:116179.
171. Li Y, Krupa B, Kang JS, Bolshakov VY, Liu G. Glycine Site of NMDA Receptor Serves as a Spatiotemporal Detector of Synaptic Activity Patterns. *J Neurophysiol*. 2009 Jul;102(1):578–89.
172. Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997 Jul 22;94(15):8093–8.
173. Cattani D, de Liz Oliveira Cavalli VL, Heinz Rieg CE, Domingues JT, Dal-Cim T, Tasca CI, et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*. 2014 Jun;320:34–45.
174. Cattani D, Cesconetto PA, Tavares MK, Parisotto EB, De Oliveira PA, Rieg CEH, et al. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology*. 2017 Jul;387:67–80.
175. Biosca-Brull J, Pérez-Fernández C, Mora S, Carrillo B, Pinos H, Conejo NM, et al. Relationship between Autism Spectrum Disorder and Pesticides: A Systematic Review of Human and Preclinical Models. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 May 13;18(10):5190.
176. Pu Y, Yang J, Chang L, Qu Y, Wang S, Zhang K, et al. Maternal glyphosate exposure causes autism-like behaviors in offspring through increased expression of soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 May 26;117(21):11753–9.
177. Pu Y, Ma L, Shan J, Wan X, Hammock BD, Hashimoto K. Autism-like Behaviors in Male Juvenile Offspring after Maternal Glyphosate Exposure. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*. 2021 Aug 31;19(3):554–8.
178. Moisan F, Spinosi J, Delabre L, Gourlet V, Mazurie JL, Bénatru I, et al. Association of Parkinson's Disease and Its Subtypes with Agricultural Pesticide Exposures in Men: A Case–Control Study in France. *Environ Health Perspect*. 2015 Nov;123(11):1123–9.
179. Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis*. 2018 Dec 18;8(s1):S3–8.
180. Hirsch EC. Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann Neurol*. 1992;32(S1):S88–93.
181. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53(S3):S26–38.
182. Gui Y xing, Fan X ning, Wang H mei, Wang G, Chen S di. Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. *Neurotoxicol Teratol*. 2012 May;34(3):344–9.

183. Evstigneeva ZG, Solov'eva NA, Sidel'nikova LI. Methionine Sulfoximine and Phosphinothrycin: A Review of Their Herbicidal Activity and Effects on Glutamine Synthetase. *Appl Biochem Microbiol.* 2003;39(6):539–43.
184. Huizenga JR, Gips CH, Tangerman A. The Contribution of Various Organs to Ammonia Formation: A Review of Factors Determining the Arterial Ammonia Concentration. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine.* 1996 Jan 29;33(1):23–30.
185. Hertz L, Murthy ChRK, Lai JCK, Fitzpatrick SM, Cooper AJL. Some metabolic effects of ammonia on astrocytes and neurons in primary cultures. *Neurochem Pathol.* 1987 Feb;6(1–2):97–129.
186. Mao Y chiao, Wang JD, Hung DZ, Deng JF, Yang CC. Hyperammonemia following glufosinate-containing herbicide poisoning: A potential marker of severe neurotoxicity. *Clin Toxicol.* 2011 Jan 3;49(1):48–52.
187. Butterworth RF. Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. *Drugs.* 2019 Feb 31;79(S1):17–21.
188. Casida JE. Organophosphorus Xenobiotic Toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017 Jan 6;57(1):309–27.
189. Wolterink G, Mahieu CM, Davies L. Glufosinate-Ammonium. *EVALUATIONS*, 547. 2013;
190. Koyama K, Koyama K, Goto K. Cardiovascular Effects of a Herbicide Containing Glufosinate and a Surfactant: In Vitro and In Vivo Analyses in Rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Aug;145(2):409–14.
191. Watanabe T, Sano T. Neurological effects of glufosinate poisoning with a brief review. *Hum Exp Toxicol.* 1998 Jan 2;17(1):35–9.
192. Aris A, Leblanc S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reproductive Toxicology.* 2011 May;31(4):528–33.
193. Avila-Garcia W V., Mallory-Smith C. Glyphosate-Resistant Italian Ryegrass (*Lolium perenne*) Populations also Exhibit Resistance to Glufosinate. *Weed Sci.* 2011 Sep 20;59(3):305–9.
194. Watanabe T, Iwase T. Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1996;16(6):287–99.
195. Laugeray A, Oummedi A, Jourdain C, Feat J, Meyer-Dilhet G, Menuet A, et al. Perinatal Exposure to the Cyanotoxin β -N-Méthylamino-l-Alanine (BMAA) Results in Long-Lasting Behavioral Changes in Offspring—Potential Involvement of DNA Damage and Oxidative Stress. *Neurotox Res.* 2018 Jan 6;33(1):87–112.
196. Laugeray A, Herzine A, Perche O, HÃ©bert B, Aguillon-Nauray M, Richard O, et al. Pre- and Postnatal Exposure to Low Dose Glufosinate Ammonium Induces Autism-Like Phenotypes in Mice. *Front Behav Neurosci.* 2014 Nov 20;8.
197. Herzine A, Laugeray A, Feat J, Menuet A, Quesniaux V, Richard O, et al. Perinatal Exposure to Glufosinate Ammonium Herbicide Impairs Neurogenesis and Neuroblast Migration through Cytoskeleton Destabilization. *Front Cell Neurosci.* 2016 Aug 9;10.
198. Gross PM, Weindl A, Knigge KM. Peering through the Windows of the Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 1987 Dec 28;7(6):663–72.

199. Moysé E, Bauer S, Charrier C, Coronas V, Krantic S, Jean A. Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: New vistas about autonomic regulations—a review. *Autonomic Neuroscience*. 2006 Jun;126–127:50–8.
200. Feat-Vetel J, Larrigaldie V, Meyer-Dilhet G, Herzine A, Mougin C, Laugeray A, et al. Multiple effects of the herbicide glufosinate-ammonium and its main metabolite on neural stem cells from the subventricular zone of newborn mice. *Neurotoxicology*. 2018 Dec;69:152–63.
201. Del Bigio MR. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan 19;119(1):55–73.
202. Zimmerman D, Goto JJ, Krishnan V V. Equilibrium Dynamics of β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Its Carbamate Adducts at Physiological Conditions. *PLoS One*. 2016 Aug 11;11(8):e0160491.
203. Hoerlein G. Glufosinate (Phosphinothricin), A Natural Amino Acid with Unexpected Herbicidal Properties. In 1994. p. 73–145.
204. Windmueller HG, Spaeth AE. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys*. 1975 Dec;171(2):662–72.
205. Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids*. 2013 Sep 18;45(3):413–8.
206. Janke C, Chloë Bulinski J. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Dec 16;12(12):773–86.
207. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb;30(1–2):42–59.
208. Brosnan JT. Glutamate, at the Interface between Amino Acid and Carbohydrate Metabolism. *J Nutr*. 2000 Apr;130(4):988S-990S.
209. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 2001 Sep;65(1):1–105.
210. Lodge D. The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology*. 2009 Jan;56(1):6–21.
211. Buldakova SL, Vorobjev VS, Sharonova IN, Samoilova M V, Magazanik LG. Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460. *Brain Res*. 1999 Oct;846(1):52–8.
212. Ceprian M, Fulton D. Glial Cell AMPA Receptors in Nervous System Health, Injury and Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 May 17;20(10):2450.
213. Anggono V, Haganir RL. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2012 Jun;22(3):461–9.
214. Newcombe J, Uddin A, Dove R, Patel B, Turski L, Nishizawa Y, et al. Glutamate Receptor Expression in Multiple Sclerosis Lesions. *Brain Pathology*. 2008 Jan;18(1):52–61.
215. Cheng XL, Ding F, Li H, Tan XQ, Liu X, Cao JM, et al. Activation of AMPA receptor promotes TNF- α release via the ROS-cSrc-NF κ B signaling cascade in RAW264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 May;461(2):275–80.

216. Herguedas B, Watson JF, Ho H, Cais O, García-Nafría J, Greger IH. Architecture of the heteromeric GluA1/2 AMPA receptor in complex with the auxiliary subunit TARP γ 8. *Science* (1979). 2019 Apr 26;364(6438).
217. Panatier A, Robitaille R. Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. *Neuroscience*. 2016 May;323:29–34.
218. Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, et al. Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell*. 2006 May;125(4):775–84.
219. Stone TW. Subtypes of NMDA receptors. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1993 Jul;24(4):825–32.
220. Bauminger H, Gaisler-Salomon I. Beyond NMDA Receptors: Homeostasis at the Glutamate Tripartite Synapse and Its Contributions to Cognitive Dysfunction in Schizophrenia. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 3;23(15):8617.
221. Cox MF, Hascup ER, Bartke A, Hascup KN. Friend or Foe? Defining the Role of Glutamate in Aging and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging*. 2022 Jun 16;3.
222. Seillier C, Lesept F, Toutirais O, Potzeha F, Blanc M, Vivien D. Targeting NMDA Receptors at the Neurovascular Unit: Past and Future Treatments for Central Nervous System Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 7;23(18):10336.
223. Balu DT, Li Y, Takagi S, Presti KT, Ramikie TS, Rook JM, et al. An mGlu5-Positive Allosteric Modulator Rescues the Neuroplasticity Deficits in a Genetic Model of NMDA Receptor Hypofunction in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Jul 7;41(8):2052–61.
224. Doumazane E, Scholler P, Zwier JM, Trinquet E, Rondard P, Pin J. A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *The FASEB Journal*. 2011 Jan 8;25(1):66–77.
225. Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res*. 2006 Nov 18;326(2):483–504.
226. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010 Feb 1;50(1):295–322.
227. Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med*. 2016 Mar 3;22(3):238–49.
228. Aronica E, Nicoletti F, Condorelli DF, Balázs R. Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem Res*. 1993 May;18(5):605–12.
229. Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Aug 18;106(33):14108–13.
230. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development. *Front Hum Neurosci*. 2016 Nov 8;10.
231. van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*. 2002 Feb;415(6875):1030–4.

232. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1313–7.
233. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. 1965 Jun;124(3):319–35.
234. PISTIKOVA A, BROZKA H, STUCHLIK A. Adult Neurogenesis in the Hippocampus From a Perspective of Discrimination and Generalization: A Hypothesis. *Physiol Res*. 2017 Jun 30;441–8.
235. Babcock KR, Page JS, Fallon JR, Webb AE. Adult Hippocampal Neurogenesis in Aging and Alzheimer’s Disease. *Stem Cell Reports*. 2021 Apr;16(4):681–93.
236. Bressan C, Saghatelian A. Intrinsic Mechanisms Regulating Neuronal Migration in the Postnatal Brain. *Front Cell Neurosci*. 2021 Jan 13;14.
237. Cebrian-Silla A, Nascimento MA, Redmond SA, Mansky B, Wu D, Obernier K, et al. Single-cell analysis of the ventricular-subventricular zone reveals signatures of dorsal and ventral adult neurogenesis. *Elife*. 2021 Jul 14;10.
238. Alvarez-Buylla A. Mechanism of migration of olfactory bulb interneurons. *Semin Cell Dev Biol*. 1997 Apr;8(2):207–13.
239. Kantzer CG, Parmigiani E, Cerrato V, Tomiuk S, Knauel M, Jungblut M, et al. ACSA-2 and GLAST classify subpopulations of multipotent and glial-restricted cerebellar precursors. *J Neurosci Res*. 2021 Sep 31;99(9):2228–49.
240. Platel JC, Stamboulian S, Nguyen I, Bordey A. Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev*. 2010 May;63(1–2):60–71.
241. García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. *J Neurobiol*. 1998 Aug;36(2):234–48.
242. Alvarez-Buylla A, Lois C. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. *Stem Cells*. 1995 Jan 23;13(3):263–72.
243. Wichterle H, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Direct Evidence for Homotypic, Glia-Independent Neuronal Migration. *Neuron*. 1997 May;18(5):779–91.
244. Kobayashi T, Ahlenius H, Thored P, Kobayashi R, Kokaia Z, Lindvall O. Intracerebral Infusion of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Promotes Striatal Neurogenesis After Stroke in Adult Rats. *Stroke*. 2006 Sep;37(9):2361–7.
245. Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, et al. Subventricular Zone-Derived Neuroblasts Migrate and Differentiate into Mature Neurons in the Post-Stroke Adult Striatum. *Journal of Neuroscience*. 2006 Jun 14;26(24):6627–36.
246. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010 Jan 22;119(1):37–53.
247. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 2019 Nov 12;8(11):1424.
248. Faivre-Sarrailh C, Devaux JJ. Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci*. 2013;7.

249. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*. 2015 Aug 12;63(8):1320–9.
250. Wheeler MA, Quintana FJ. Regulation of Astrocyte Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Jan;9(1):a029009.
251. Haim L Ben, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Jan 1;18(1):31–41.
252. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006 Jan 1;7(1):41–53.
253. Blank T, Prinz M. NF- κ B signaling regulates myelination in the CNS. *Front Mol Neurosci*. 2014 May 26;7.
254. Chandel NS. Mitochondrial Regulation of Oxygen Sensing. In 2010. p. 339–54.
255. Ponath G, Ramanan S, Mubarak M, Housley W, Lee S, Sahinkaya FR, et al. Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology. *Brain*. 2017 Feb;140(2):399–413.
256. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May 20;13(5):816–25.
257. Fields RD, Stevens-Graham B. New Insights into Neuron-Glia Communication. *Science* (1979). 2002 Oct 18;298(5593):556–62.
258. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017 Jan 18;541(7638):481–7.
259. Rothhammer V, Quintana FJ. Control of autoimmune CNS inflammation by astrocytes. *Semin Immunopathol*. 2015 Nov 30;37(6):625–38.
260. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*. 2018 May 16;557(7707):724–8.
261. Linnerbauer M, Rothhammer V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol*. 2020 Sep 30;11.
262. Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, et al. Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity*. 2012 Dec;37(6):1050–60.
263. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*. 1999 Nov;117(2):145–52.
264. Vay SU, Flitsch LJ, Rabenstein M, Rogall R, Blaschke S, Kleinhaus J, et al. The plasticity of primary microglia and their multifaceted effects on endogenous neural stem cells in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation*. 2018 Dec 13;15(1):226.
265. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia Development and Function. *Annu Rev Immunol*. 2014 Mar 21;32(1):367–402.
266. Duan N, Zhang Y, Tan S, Sun J, Ye M, Gao H, et al. Therapeutic targeting of STING-TBK1-IRF3 signalling ameliorates chronic stress induced depression-like behaviours by modulating neuroinflammation and microglia phagocytosis. *Neurobiol Dis*. 2022 Jul;169:105739.

267. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2006 Jan;31(1):149–60.
268. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *Journal of Neuroscience*. 2014 Feb 5;34(6):2231–43.
269. Rangaraju S, Dammer EB, Raza SA, Rathakrishnan P, Xiao H, Gao T, et al. Identification and therapeutic modulation of a pro-inflammatory subset of disease-associated-microglia in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2018 Dec 21;13(1):24.
270. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016 Oct;139:136–53.
271. Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, Seker E. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2020 Dec 11;17(1):155.
272. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*. 2021 Mar 15;24(3):312–25.
273. Ben Achour S, Pascual O. Glia: The many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochem Int*. 2010 Nov;57(4):440–5.
274. Dunn AJ, Wang J, Ando T. Effects of Cytokines on Cerebral Neurotransmission. In 1999. p. 117–27.
275. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science (1979)*. 2003 Dec 5;302(5651):1760–5.
276. Rodgers JT, King KY, Brett JO, Cromie MJ, Charville GW, Maguire KK, et al. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to GAlert. *Nature*. 2014 Jun 19;510(7505):393–6.
277. Ekdahl CT. Microglial Activation – Tuning and Pruning Adult Neurogenesis. *Front Pharmacol*. 2012;3.
278. Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. 2006 Feb 15;9(2):268–75.
279. Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*. 2007 Jul;147(4):867–83.
280. Gruol DL, Nelson TE. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol*. 1997 Dec;15(3):307–39.
281. Roberts AJ, Khom S, Bajo M, Vlkolinsky R, Polis I, Cates-Gatto C, et al. Increased IL-6 expression in astrocytes is associated with emotionality, alterations in central amygdala GABAergic transmission, and excitability during alcohol withdrawal. *Brain Behav Immun*. 2019 Nov;82:188–202.

282. Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia*. 2000 Dec;32(3):271–85.
283. Krady JK, Lin HW, Liberto CM, Basu A, Kremlev SG, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J Neurosci Res*. 2008 May 15;86(7):1538–47.
284. Eskes C, Honegger P, Juillerat-Jeanneret L, Monnet-Tschudi F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. *Glia*. 2002 Jan;37(1):43–52.
285. Chen Z, Palmer TD. Differential roles of TNFR1 and TNFR2 signaling in adult hippocampal neurogenesis. *Brain Behav Immun*. 2013 May;30:45–53.
286. Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJH, Bonde S, Kokaia Z, et al. Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Is a Negative Regulator of Progenitor Proliferation in Adult Hippocampal Neurogenesis. *The Journal of Neuroscience*. 2006 Sep 20;26(38):9703–12.
287. Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel ULM. Tumor Necrosis Factor (TNF)-mediated Neuroprotection against Glutamate-induced Excitotoxicity Is Enhanced by N-Methyl-D-aspartate Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jul;279(31):32869–81.
288. Ranzinger J, Krippner-Heidenreich A, Haraszti T, Bock E, Tepperink J, Spatz JP, et al. Nanoscale Arrangement of Apoptotic Ligands Reveals a Demand for a Minimal Lateral Distance for Efficient Death Receptor Activation. *Nano Lett*. 2009 Dec 9;9(12):4240–5.
289. Belenguer G, Duart-Abadia P, Jordán-Pla A, Domingo-Muelas A, Blasco-Chamarro L, Ferrón SR, et al. Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*. 2021 Feb;28(2):285-299.e9.
290. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res*. 1989 Jul;491(2):394–7.
291. Covacu R, Arvidsson L, Andersson A, Khademi M, Erlandsson-Harris H, Harris RA, et al. TLR Activation Induces TNF- α Production from Adult Neural Stem/Progenitor Cells. *The Journal of Immunology*. 2009 Jun 1;182(11):6889–95.
292. Lathia JD, Okun E, Tang SC, Griffioen K, Cheng A, Mughal MR, et al. Toll-Like Receptor 3 Is a Negative Regulator of Embryonic Neural Progenitor Cell Proliferation. *The Journal of Neuroscience*. 2008 Dec 17;28(51):13978–84.
293. Grasselli C, Ferrari D, Zalfa C, Soncini M, Mazzoccoli G, Facchini FA, et al. Toll-like receptor 4 modulation influences human neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 15;9(3):280.
294. Frankola K, Greig N, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-Alpha to Elucidate and Ameliorate Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 May 1;10(3):391–403.
295. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017 Apr 26;35(1):441–68.
296. Wu B, Chen Y, Huang J, Ning Y, Bian Q, Shan Y, et al. Icariin improves cognitive deficits and activates quiescent neural stem cells in aging rats. *J Ethnopharmacol*. 2012 Aug;142(3):746–53.

297. Koo JW, Duman RS. IL-1 β is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Jan 15;105(2):751–6.
298. Das M, Mayilsamy K, Tang X, Han JY, Foran E, Willing AE, et al. Pioglitazone treatment prior to transplantation improves the efficacy of human mesenchymal stem cells after traumatic brain injury in rats. *Sci Rep*. 2019 Sep 20;9(1):13646.
299. Hurley SD, Walter SA, Semple-Rowland SL, Streit WJ. Cytokine transcripts expressed by microglia in vitro are not expressed by amoeboid microglia of the developing rat central nervous system. *Glia*. 1999 Feb 1;25(3):304–9.
300. Moser B. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*. 2004 Nov 1;63(suppl_2):ii84–9.
301. Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of Chemokines in CNS Health and Pathology: A Focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 Networks. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010 Mar 11;30(3):459–73.
302. Jin L, Batra S, Douda DN, Palaniyar N, Jeyaseelan S. CXCL1 Contributes to Host Defense in Polymicrobial Sepsis via Modulating T Cell and Neutrophil Functions. *The Journal of Immunology*. 2014 Oct 1;193(7):3549–58.
303. Miklossy J. Chronic Inflammation and Amyloidogenesis in Alzheimer’s Disease -- Role of Spirochetes1. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2008 Apr 28;13(4):381–91.
304. Wee Yong V. Inflammation in Neurological Disorders: A Help or a Hindrance? *The Neuroscientist*. 2010 Aug 3;16(4):408–20.
305. Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Jun 20;16(6):358–72.
306. KRISTIANSEN L, HUERTA I, BENEYTO M, MEADORWOODRUFF J. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Feb;7(1):48–55.
307. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *Eur J Neurosci*. 2006 Aug;24(3):645–53.
308. Keilhoff G, Bernstein HG, Becker A, Grecksch G, Wolf G. Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2004 Sep;56(5):317–22.
309. Martin E, Amar M, Dalle C, Youssef I, Boucher C, Le Duigou C, et al. New role of P2X7 receptor in an Alzheimer’s disease mouse model. *Mol Psychiatry*. 2019 Jan 22;24(1):108–25.
310. Messemer N, Kunert C, Grohmann M, Sobottka H, Nieber K, Zimmermann H, et al. P2X7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. *Neuropharmacology*. 2013 Oct;73:122–37.
311. Lord B, Ameriks MK, Wang Q, Fourgeaud L, Vliegen M, Verluyten W, et al. A novel radioligand for the ATP-gated ion channel P2X7: [3H] JNJ-54232334. *Eur J Pharmacol*. 2015 Oct;765:551–9.
312. Kaczmarek-Hájek K, Lőrinczi É, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal*. 2012 Sep 1;8(3):375–417.

313. Gil-Redondo JC, Iturri J, Trueba Y, Benito-León M, Pérez-Sen R, Delicado EG, et al. Nucleotide-Induced Nanoscale Changes in the Mechanical Properties of Rat Cerebellar Astrocytes: Selective Stimulation and Blocking of the Purinergic Receptor P2X7. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 7;23(19):11927.
314. Yamada KM, Cukierman E. Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*. 2007 Aug;130(4):601–10.
315. Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992 Oct;89(19):9064–8.
316. Hess MW, Pfaller K, Ebner HL, Beer B, Hekl D, Seppi T. 3D Versus 2D Cell Culture. In 2010. p. 649–70.
317. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 11;22(22):12200.
318. Bresciani G, Hofland LJ, Dogan F, Giamas G, Gagliano T, Zatelli MC. Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Oct 4;10.
319. Masseret E, Banack S, Boumédiène F, Abadie E, Brient L, Pernet F, et al. Dietary BMAA Exposure in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Cluster from Southern France. *PLoS One*. 2013 Dec 13;8(12):e83406.
320. Mondo K, Hammerschlag N, Basile M, Pablo J, Banack SA, Mash DC. Cyanobacterial Neurotoxin β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) in Shark Fins. *Mar Drugs*. 2012 Feb 21;10(12):509–20.
321. Hammerschlag N, Davis D, Mondo K, Seely M, Murch S, Glover W, et al. Cyanobacterial Neurotoxin BMAA and Mercury in Sharks. *Toxins (Basel)*. 2016 Aug 16;8(8):238.
322. Tartaglione AM, Venerosi A, Calamandrei G. Early-Life Toxic Insults and Onset of Sporadic Neurodegenerative Diseases—an Overview of Experimental Studies. In 2015. p. 231–64.
323. Rice D, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108(suppl 3):511–33.
324. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology*. 2016 Apr 1;157(4):1328–40.
325. Tofighi R, Moors M, Bose R, Ibrahim WNW, Ceccatelli S. Neural Stem Cells for Developmental Neurotoxicity Studies. In 2011. p. 67–80.
326. Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *The Journal of Neuroscience*. 2002 Feb 1;22(3):629–34.
327. Qadri M, Jay GD, Zhang LX, Schmidt TA, Totonchy J, Elsaid KA. Proteoglycan-4 is an essential regulator of synovial macrophage polarization and inflammatory macrophage joint infiltration. *Arthritis Res Ther*. 2021 Dec 14;23(1):241.
328. Zanier ER, Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, De Simoni MG. Shape descriptors of the “never resting” microglia in three different acute brain injury models in mice. *Intensive Care Med Exp*. 2015 Dec 24;3(1):7.

329. Coullery RP, Ferrari ME, Rosso SB. Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *Neurotoxicology*. 2016 Jan;52:150–61.
330. Homem CCF, Repic M, Knoblich JA. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Nov 30;16(11):647–59.
331. Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 May;8(5):a018820.
332. Obernier K, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*. 2019 Feb 15;146(4).
333. Horgusluoglu E, Nudelman K, Nho K, Saykin AJ. Adult neurogenesis and neurodegenerative diseases: A systems biology perspective. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2017 Jan;174(1):93–112.
334. Masuda T, Isobe Y, Aihara N, Furuyama F, Misumi S, Kim TS, et al. Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett*. 2007 Sep 25;425(2):114–9.
335. Korn A, Höfling C, Zeitschel U, Krueger M, Roßner S, Huster D. Incorporation of the Nonproteinogenic Amino Acid β -Methylamino-alanine Affects Amyloid β Fibril Properties and Toxicity. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(7):1038–47.
336. Di Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, et al. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ*. 2005 Aug;12(8):1124–33.
337. Scopa C, Marrocco F, Latina V, Ruggeri F, Corvaglia V, La Regina F, et al. Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer’s disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ*. 2020 Mar 1;27(3):934–48.
338. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience*. 2009 Feb;158(3):1021–9.
339. Tepavčević V, Lazarini F, Alfaro-Cervello C, Kerninon C, Yoshikawa K, Garcia-Verdugo JM, et al. Inflammation-induced subventricular zone dysfunction leads to olfactory deficits in a targeted mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2011 Dec 1;121(12):4722–34.
340. Fritze J, Ginisty A, McDonald R, Quist E, Stamp E, Monni E, et al. Loss of Cxcr5 alters neuroblast proliferation and migration in the aged brain. *Stem Cells*. 2020 Sep 1;38(9):1175–87.
341. Pantelis C, Jayaram M, Hannan AJ, Wesselingh R, Nithianantharajah J, Wannan CM, et al. Neurological, neuropsychiatric and neurodevelopmental complications of COVID-19. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 2021 Aug 1;55(8):750–62.
342. Borst K, Dumas AA, Prinz M. Microglia: Immune and non-immune functions. *Immunity*. 2021 Oct;54(10):2194–208.
343. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (1979)*. 2005 May 27;308(5726):1314–8.

344. Bernardino L, Agasse F, Silva B, Ferreira R, Grade S, Malva JO. Tumor Necrosis Factor- α Modulates Survival, Proliferation, and Neuronal Differentiation in Neonatal Subventricular Zone Cell Cultures. *Stem Cells*. 2008 Sep 1;26(9):2361–71.
345. Meng QQ, Liang XJ, Wang P, Wang XP, Yang JW, Wu YF, et al. Rosiglitazone enhances the proliferation of neural progenitor cells and inhibits inflammation response after spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 2011 Oct 10;503(3):191–5.
346. Borhani-Haghighi M, Mohamadi Y. The protective effects of neural stem cells and neural stem cells-conditioned medium against inflammation-induced prenatal brain injury. *J Neuroimmunol*. 2021;360:577707.
347. Silva DF, Candeias E, Esteves AR, Magalhães JD, Ferreira IL, Nunes-Costa D, et al. Microbial BMAA elicits mitochondrial dysfunction, innate immunity activation, and Alzheimer’s disease features in cortical neurons. *J Neuroinflammation*. 2020 Dec 5;17(1):332.
348. Bhat SA, Henry RJ, Blanchard AC, Stoica BA, Loane DJ, Faden AI. Enhanced Akt/GSK-3 β /CREB signaling mediates the anti-inflammatory actions of mGluR5 positive allosteric modulators in microglia and following traumatic brain injury in male mice. *J Neurochem*. 2021 Jan 28;156(2):225–48.
349. Byrnes KR, Stoica B, Loane DJ, Riccio A, Davis MI, Faden AI. Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. *Glia*. 2009 Apr 1;57(5):550–60.
350. Havens KE, James RT, East TL, Smith VH. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution*. 2003 Apr;122(3):379–90.
351. Heisler J, Glibert PM, Burkholder JM, Anderson DM, Cochlan W, Dennison WC, et al. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*. 2008 Dec;8(1):3–13.
352. Lista S, O’Bryant SE, Blennow K, Dubois B, Hugon J, Zetterberg H, et al. Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2015 Jul 24;47(2):291–317.
353. Boyd RJ, Avramopoulos D, Jantzie LL, McCallion AS. Neuroinflammation represents a common theme amongst genetic and environmental risk factors for Alzheimer and Parkinson diseases. *J Neuroinflammation*. 2022 Sep 8;19(1):223.
354. Danjo Y, Shigetomi E, Hirayama YJ, Kobayashi K, Ishikawa T, Fukazawa Y, et al. Transient astrocytic mGluR5 expression drives synaptic plasticity and subsequent chronic pain in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2022 Apr 4;219(4).
355. Alvarado-Suárez GB, Silva-Briano M, Arzate-Cárdenas MA, Carbajal-Hernández AL, Yáñez-Rivera B, Rico-Martínez R. Feeding behavior of early life stages of the zebrafish *Danio rerio* is altered by exposure to glyphosate. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022 Dec 6;29(56):85172–84.
356. Main BJ, Dunlop RA, Rodgers KJ. The use of L-serine to prevent β -methylamino-L-alanine (BMAA)-induced proteotoxic stress in vitro. *Toxicol*. 2016 Jan;109:7–12.
357. Martínez MA, Rodríguez JL, Lopez-Torres B, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Maximiliano JE, et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on

- oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. *Environ Int.* 2020 Feb;135:105414.
358. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* (1979). 2010 Nov 5;330(6005):841–5.
359. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016 Mar 22;113(12).
360. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007 Nov 26;10(11):1387–94.
361. Kim M, Jung K, Kim IS, Lee IS, Ko Y, Shin JE, et al. TNF- α induces human neural progenitor cell survival after oxygen–glucose deprivation by activating the NF- κ B pathway. *Exp Mol Med.* 2018 Apr 6;50(4):1–14.
362. Heidari A, Yazdanpanah N, Rezaei N. The role of Toll-like receptors and neuroinflammation in Parkinson’s disease. *J Neuroinflammation.* 2022 Jun 6;19(1):135.
363. Saijo K, Crotti A, Glass CK. Nuclear receptors, inflammation, and neurodegenerative diseases. *Adv Immunol.* 2010;106:21–59.
364. Goulson D. Pesticides linked to bird declines. *Nature.* 2014 Jul 9;511(7509):295–6.
365. Tassin de Montaigu C, Goulson D. Habitat quality, urbanisation & pesticides influence bird abundance and richness in gardens. *Science of The Total Environment.* 2023 Apr;870:161916.
366. Mayne GJ, Bishop CA, Martin PA, Boermans HJ, Hunter B. Thyroid Function in Nestling Tree Swallows and Eastern Bluebirds Exposed to Non-Persistent Pesticides and p,p’-DDE in Apple Orchards of Southern Ontario, Canada. *Ecotoxicology.* 2005 Apr;14(3):381–96.
367. Pandey SP, Mohanty B. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis on co-exposures to dithiocarbamate and neonicotinoid pesticides: Study in a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Neurotoxicology.* 2017 May;60:16–22.
368. Pandey SP, Mohanty B. The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary–thyroid axis of a wildlife bird. *Chemosphere.* 2015 Mar;122:227–34.
369. Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, et al. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 2013 Mar 7;4(3):e525–e525.
370. van Onselen R, Downing TG. BMAA-protein interactions: A possible new mechanism of toxicity. *Toxicon.* 2018 Mar;143:74–80.
371. Sil S, Ghosh T, Ghosh R. NMDA receptor is involved in neuroinflammation in intracerebroventricular colchicine-injected rats. *J Immunotoxicol.* 2016 Jul 3;13(4):474–89.
372. Armentero MT, Fancellu R, Nappi G, Bramanti P, Blandini F. Prolonged blockade of NMDA or mGluR5 glutamate receptors reduces nigrostriatal degeneration while inducing selective metabolic changes in the basal ganglia circuitry in a rodent model of Parkinson’s disease. *Neurobiol Dis.* 2006 Apr;22(1):1–9.

373. Kang Y, Henchcliffe C, Verma A, Vallabhajosula S, He B, Kothari PJ, et al. 18F-FPEB PET/CT Shows mGluR5 Upregulation in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroimaging*. 2019 Jan;29(1):97–103.
374. Zhang YN, Fan JK, Gu L, Yang HM, Zhan SQ, Zhang H. Metabotropic glutamate receptor 5 inhibits α -synuclein-induced microglia inflammation to protect from neurotoxicity in Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2021 Dec 18;18(1):23.
375. Platel JC, Lacar B, Bordey A. GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol*. 2007 Aug 7;38(4):303–11.
376. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):645–60.
377. Gould E, Cameron HA, McEwen BS. Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 1994 Feb 22;340(4):551–65.
378. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Front Cell Neurosci*. 2015 Dec 17;9.
379. Zhou W, Hinoue T, Barnes B, Mitchell O, Iqbal W, Lee SM, et al. DNA methylation dynamics and dysregulation delineated by high-throughput profiling in the mouse. *Cell Genomics*. 2022 Jul;2(7):100144.
380. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014 Jan 13;9(1):3–12.
381. Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares JM. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue Barriers*. 2014 Jan 19;2(1):e28426.
382. Zhao H, Ming T, Tang S, Ren S, Yang H, Liu M, et al. Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Mol Cancer*. 2022 Dec 14;21(1):144.
383. Freese JL, Pino D, Pleasure SJ. Wnt signaling in development and disease. *Neurobiol Dis*. 2010 May;38(2):148–53.
384. Bielen H, Houart C. The Wnt cries many: Wnt regulation of neurogenesis through tissue patterning, proliferation, and asymmetric cell division. *Dev Neurobiol*. 2014 Aug;74(8):772–80.
385. Bengoa-Vergniory N, Kypta RM. Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015 Nov 26;72(21):4157–72.
386. Burton B, Collins K, Brooks J, Marx K, Renner A, Wilcox K, et al. The biotoxin BMAA promotes dysfunction via distinct mechanisms in neuroblastoma and glioblastoma cells. *PLoS One*. 2023 Mar 9;18(3):e0278793.
387. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug;126(4):663–76.
388. Zhang J, Nuebel E, Daley GQ, Koehler CM, Teitell MA. Metabolic Regulation in Pluripotent Stem Cells during Reprogramming and Self-Renewal. *Cell Stem Cell*. 2012 Nov;11(5):589–95.
389. Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 2008 Jul 22;26(7):795–7.

390. Passarelli JP, Nimjee SM, Townsend KL. Stroke and Neurogenesis: Bridging Clinical Observations to New Mechanistic Insights from Animal Models. *Transl Stroke Res.* 2022 Dec 3;
391. Shimada Y, Ishii N, Higuchi T, Goto M, Ohashi T, Kobayashi H. A novel preclinical model of mucopolysaccharidosis type II for developing human hematopoietic stem cell gene therapy. *Gene Ther.* 2023 Apr 14;30(3–4):288–96.
392. Sreenivasamurthy S, Laul M, Zhao N, Kim T, Zhu D. Current progress of cerebral organoids for modeling Alzheimer’s disease origins and mechanisms. *Bioeng Transl Med.* 2023 Mar 2;8(2).

Annexes

Article n°1: Fucoxanthin, a Marine-Derived Carotenoid from Brown Seaweeds and Microalgae: A Promising Bioactive Compound for Cancer Therapy (2020)



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Fucoxanthin, a Marine-Derived Carotenoid from Brown Seaweeds and Microalgae: A Promising Bioactive Compound for Cancer Therapy

Sarah Méresse ^{1,2,3}, Mostefa Fodil ¹, Fabrice Fleury ² and Benoît Chénais ^{1,*}

¹ EA 2160 Mer Molécules Santé, Le Mans Université, F-72085 Le Mans, France;

Sarah.Meresse@cnr-orleans.fr (S.M.); Mostefa.Fodil@univ-lemans.fr (M.F.)

² UMR 6286 CNRS Unité Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; Fabrice.Fleury@univ-nantes.fr

³ UMR 7355 CNRS Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires, F-45071 Orléans, France

* Correspondence: bchenais@univ-lemans.fr; Tel.: +33-243-833-251

Received: 23 October 2020; Accepted: 2 December 2020; Published: 4 December 2020



Abstract: Fucoxanthin is a well-known carotenoid of the xanthophyll family, mainly produced by marine organisms such as the macroalgae of the fucus genus or microalgae such as *Phaeodactylum tricorutum*. Fucoxanthin has antioxidant and anti-inflammatory properties but also several anticancer effects. Fucoxanthin induces cell growth arrest, apoptosis, and/or autophagy in several cancer cell lines as well as in animal models of cancer. Fucoxanthin treatment leads to the inhibition of metastasis-related migration, invasion, epithelial–mesenchymal transition, and angiogenesis. Fucoxanthin also affects the DNA repair pathways, which could be involved in the resistance phenotype of tumor cells. Moreover, combined treatments of fucoxanthin, or its metabolite fucoxanthinol, with usual anticancer treatments can support conventional therapeutic strategies by reducing drug resistance. This review focuses on the current knowledge of fucoxanthin with its potential anticancer properties, showing that fucoxanthin could be a promising compound for cancer therapy by acting on most of the classical hallmarks of tumor cells.

Keywords: angiogenesis; apoptosis; cancer; cell growth arrest; DNA repair; EMT; fucoxanthin; inflammation; invasion; migration

1. Introduction

Carotenoids are colored and natural pigments widely distributed in nature. They include more than 1100 molecules [1], divided into two classes: xanthophylls, which contain oxygen, and carotenes, which are pure hydrocarbons. In photosynthetic organisms such as plants and algae, carotenoids have two major roles: they absorb energy for photosynthesis and also protect chlorophyll from photodamage [2]. At a structural level, xanthophyll pigments are close to each other, they share a long carbon chain containing one or more oxygen atoms, which differentiates them from carotenes. These carotenoids pigments are well-known for their antioxidant and anti-inflammatory properties [3–5], but they also display some potential anticancer effects.

First isolated in 1914 by Willstätter and Page, fucoxanthin (Figure 1) is an orange-colored xanthophyll pigment derived from brown algae and microalgae [6–8]. It is found in high content in taxons such as Phaeophyceae, Haptophyta, Bacillariophyceae, and Chrysophyceae, and to a lesser extent in Rhodophyta, Raphidophyceae, and Dinophyta [9]. Fucoxanthin is one of the most abundant carotenoid pigments, which contributes to more than 10% of the estimated total carotenoid production in nature, particularly in the marine environment [10].

Popular sources of fucoxanthin include macroalgae such as *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis*, and the well-known brown seaweed Wakame (*Undaria pinnatifida*), as well as diatoms microalgae

such as *Phaeodactylum tricornerutum* [11] (Table 1). Fucoxanthin exhibit several biological activities that are beneficial to human health including antioxidant, anti-inflammatory, anti-obesity, anti-diabetic, anti-angiogenic, and anticancer properties [12–17].

Table 1. Source and concentration of fucoxanthin in different algal samples.

Class	Species	Fucoxanthin Yield (mg/g)	References
Macroalgae	Phaeophyceae	<i>Alaria crassifolia</i>	0.04 ^a [18]
		<i>Cladosiphon okamuranus</i>	- [19,20]
		<i>Cystoseira hakodatensis</i>	1.53 ^a [18]
		<i>Dictyota coriacea</i>	6.42 ^a [21]
		<i>Eisenia bicyclis</i>	0.26 ^b –0.41 ^a [18,22]
		<i>Fucus evanescens</i> C. agardh	0.017 ^a [23]
		<i>Fucus vesiculosus</i>	0.26–1.24 [24]
		<i>Ishige okamurae</i>	- [25]
		<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	0.197 ^a [18]
		<i>Laminaria japonica</i>	0.03 ^b –0.19 ^b [26,27]
		<i>Myagropsis myagroides</i>	9.01 ^a [21]
		<i>Padina tetrastromatica</i>	0.18 ^b [28]
		<i>Petalonia binghamiae</i>	0.43 ^b –0.58 ^b [29]
		<i>Saccharina japonica</i>	- [30]
		<i>Sargassum fusiformis</i>	0.01 ^a –0.02 ^b [26,27]
		<i>Sargassum binderi</i>	0.73 ^a [31]
		<i>Sargassum duplicatum</i>	1.01 ^a [31]
		<i>Sargassum hemiphyllum</i>	- [16]
		<i>Sargassum horneri</i>	1.10 ^a [18]
		<i>Sargassum plagyophyllum</i>	0.71 ^a [31]
		<i>Sargassum polycystum</i>	0.31 ^a [32]
		<i>Sargassum siliquastrum</i>	0.75 ^a [33,34]
		<i>Sargassum siliquosum</i>	1.41 ^a [32]
		<i>Scytosiphon lomentaria</i>	0.24 ^b –0.56 ^b [29]
		<i>Sphaerotrichia divaricata</i>	0.11 ^a –1.48 ^a [35]
		<i>Turbinaria decurrens</i>	0.65 ^a [36]
<i>Turbinaria turbinata</i>	0.59 ^a [31]		
<i>Undaria pinnatifida</i>	0.11 ^b –1.09 ^a [26,27]		

Table 1. Cont.

	Class	Species	Fucoxanthin Yield (mg/g)	References
Microalgae	Bacillariophyceae	<i>Cyclotella</i> sp.	0.7 ^a –2.3 ^a	[37]
		<i>Nitzschia</i> sp.	4.92 ^a –5.5 ^a	[22,37]
		<i>Paralia longispina</i>	1.4 ^a	[37]
		<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	8.55 ^a –24.2 ^a	[22,37]
	Coccolithophyceae	<i>Prymnesium parvum</i>	7.91 ^a	[38]
	Chromulinaceae	<i>Chromulina ochromonoides</i>	1.32 ^a	[39]
	Chrysophyceae	<i>Ochromonas</i> sp.	0.41 ^a	[39]
		<i>Ochromonas danica</i>	3.16 ^a	[38]
	Coscinodiscophyceae	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	5.25 ^a	[40]
		<i>Ochromonas gracilis</i>	2.24 ^a	[22]
		<i>Odontella aurita</i>	21.67 ^a	[41]
	Mediophyceae	<i>Conticribra weissflogii</i> ND8	6 ^a	[42]
	Prymnesiophyceae	<i>Isochrysis</i> sp.	17 ^a	[43]
		<i>Isochrysis affinis galbana</i>	18.23 ^a	[22]
	Raphidophyceae	<i>Isochrysis galbana</i>	6.04 ^a	[22]
		<i>Olisthodiscus luteus</i>	0.08 ^a	[39]
	Symurophyceae	<i>Synura petersenii</i>	0.02 ^a	[39]
		<i>Mallomonas</i> sp. SBV13	26.6 ^a	[37]
	Zygnematophyceae	<i>Poterioochromonas malhamensis</i>	0.6 ^a	[39]
			<i>Cylindrotheca closterium</i>	5.23 ^a

^a data obtained from dry biomass; ^b data obtained from fresh biomass.

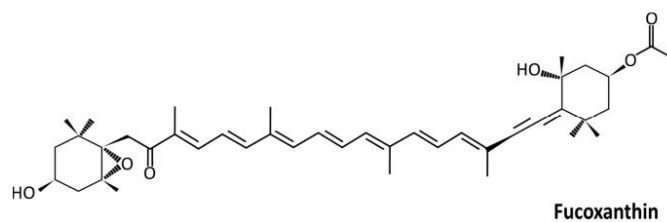


Figure 1. Structure of fucoxanthin (3'-acetoxy-5,6-epoxy-3,5'-dihydroxy-6',7'-didehydro-5,6,7,8,5',6'-hexahydro- β,β -carotene-8-one; C₄₂H₅₈O₆; 658.91 g/mol).

2. Absorption and Metabolites of Fucoxanthin

Being hydrophobic, carotenoids are absorbed in the intestine following the same path as dietary fats. Fucoxanthin has an allenic bond, a polyene chain, an acetyl, and a β,γ -epoxy ketone group (Figure 1). There is no symmetry between the two six-membered ring derivatives bound by the polyene chain: one has an allenic bond, the second has a β,γ -epoxy ketone group. In vivo, the bioactive forms of fucoxanthin are fucoxanthinol and/or amarouciaxanthin. When ingested, fucoxanthin is mainly metabolized to fucoxanthinol in the gastrointestinal tract by digestive enzymes such as lipase and cholesterol esterase by hydrolysis [45], and it is further converted to amarouciaxanthin A in the liver [46] (Figure 2a). Research on the possible effects of amarouciaxanthin A remains insufficient

in the context of cancer. Nonetheless, beneficial health effects of fucoxanthin and fucoxanthinol are well described.

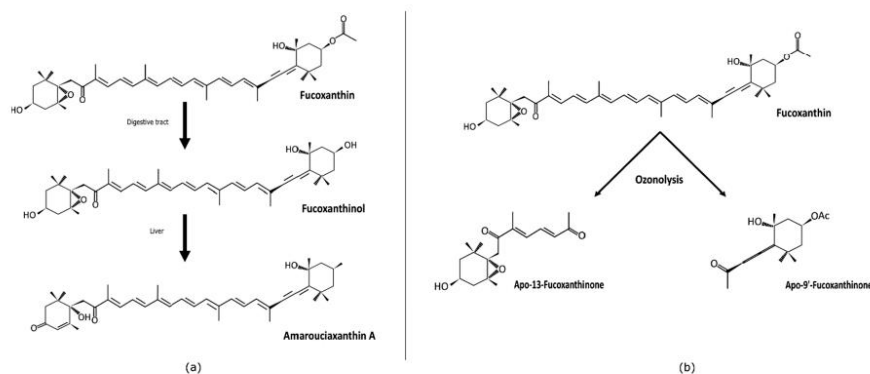


Figure 2. Natural (a) and synthetic (b) metabolites of fucoxanthin (adapted from Komba et al., 2018 [47]).

Two other synthetic metabolites could be obtained by chemical degradation (ozonolysis) of fucoxanthin apo-9'-fucoxanthinone [48] and apo-13-fucoxanthinone [49] (Figure 2b). Ozonolysis cleaved the polyene chain of fucoxanthin into two types of cyclohexyl derivatives, the first one with a β,γ -epoxy ketone group and the second one with an allenic bond. Caco-2 cells (human colorectal carcinoma) were treated with compounds resulting from fucoxanthin degradation to determine the correlation between structure and activity. From this study, the complete structure of fucoxanthin appears not indispensable for its antiproliferative effect, which could be achieved by a partial structure of the molecule [29,47].

Given the high safety of fucoxanthin and its metabolites, and their significant bioactivities and pharmacological effects, fucoxanthin has the potential to become a promising nutritional ingredient and a potential medicinal constituent for human health [50]. Here, we will discuss fucoxanthin as a potential treatment and/or preventive agent of cancer development and aggressiveness.

3. Antiproliferative Effects of Fucoxanthin through Cell Cycle Arrest in Cancer Cells

The antiproliferative effect of fucoxanthin has been reported for several cancer cell lines (Table 2), including human leukemia cell lines, K562 and TK6 [51], adult T-cell leukemia [52], B-cell malignancies, including Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, and Epstein-Barr virus-immortalized B cells [19], primary effusion lymphoma (PEL), a rare type of non-Hodgkin's lymphoma [53], human bladder cancer T24 cell line [54], melanoma cell lines (B16F10 cells) [55], human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells [56], colon adenocarcinoma cell lines WiDr and HCT116 [57], LNCap and DU145 prostate cancer cells [58–60], human neuroblastoma GOTO cell line [61], human hepatocarcinoma HepG2 cell line [59,60,62,63], SK-Hep-1 human hepatoma cells [64], cervical cancer cells HeLa [65], and osteosarcoma cell lines [20]. The inhibition of cell proliferation by fucoxanthin is due to cell growth arrest at G0/G1 or G1 phase of the cell cycle [19,20,52–55,57–62,64,65].

Table 2. In vitro effects of fucoxanthin on cancer and non-cancer cells.

Cell Type and Origin		Cell Lines	Concentration (μM)	Effects	References	
Cancer cells	Lung	Human	NSCLC-N6 A549	7.6–60.7	Apoptosis	[66]
			A549 H1299	12.5–25–50	Cell cycle arrest (G0/G1 mainly + S)	[67]
		Liver	Human	HepG2	1–10	Apoptosis
	SK-Hep-1			1–20	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[64]
	HepG2			3.8–5.5	Cell cycle arrest (G1)	[59]
	HepG2			25	Cell cycle arrest (G0/G1)	[62]
	HepG2			~20 $\mu\text{g/mL}$ *	Apoptosis	[69]
	SGC-7901			12.5–25–50	Apoptosis/Autophagy	[70]
	Gastric	Human	MGC-803	50–75	Cell cycle arrest (G2/M) Apoptosis	[56]
			DLD-1 cells	5	Inhibition of epithelial–mesenchymal transition (EMT)	[71]
	Colorectal	Human	Caco-2	7.6	Apoptosis	[72]
			HCT116 HT29	10–50–100	DNA damage	[73]
			WiDr	25–50	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[57]
			Caco-2	25	Apoptosis DNA damage	[74]
			T24	5–10	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[54]
	Bladder	Human	EJ-1	20	Apoptosis	[75]
			DU145 LNCap	3.8–5.5	Cell cycle arrest (G1)	[58,59]
	Prostate	Human	PC-3 DU145 LNCap	20	Apoptosis	[76]
			PC-3	20	Apoptosis	[77]
			MCF 7 MD-MB-231	10	Apoptosis	[78]
	Breast	Human	MCF 7	20	Protect against DNA damage	[79]
			MCF 7 MD-MB-231	20–30–40	Apoptosis	[80]
			MCF 7	25	Apoptosis/DNA damage	[74]
Cervix	Human	HeLa	0.5	Apoptosis	[81]	
		C6	6	Protect against DNA damage	[82]	
	Human	HeLa	10–20–40	Cell cycle arrest (G0/G1)	[65]	
		SiHa	20	Apoptosis	[83]	
		GOTO	7.6–15.2	G0/G1 arrest	[61]	
Neural	Human	U251	20	Apoptosis	[84]	
		U251/U87	25–50	Apoptosis/Inhibition of migration and invasion	[85]	

Table 2. Cont.

Cell Type and Origin		Cell Lines	Concentration (µM)	Effects	References	
Lymphoma	Human	Raji Daudi Ramos BJAB L428 KM-H2 HDLM-2 L540	2.5–5	Cell cycle arrest (G1; at lower concentration) Apoptosis (at higher concentration)	[19]	
		HHV-8 infected BCBL-1 and TY-1	5–10	Cell cycle arrest (G1)	[53]	
Leukemia	Human	HL-60	12.5–25	Apoptosis/DNA Damage	[74]	
		HL-60	10	Apoptosis	[86]	
		K562 TK6	10	Antiproliferative	[51]	
		MT-2/MT-4 HUT-102 ED-40515(-)	10	Cell cycle arrest (G1) Apoptosis	[52]	
Melanoma	Mouse	HL-60	15	Apoptosis	[25]	
		B16-F10	30	Inhibition of invasion and migration Growth inhibition	[30]	
Sarcoma	Human	B16-F10	50–100–200	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[55]	
		Saos 2	20	Apoptosis	[20]	
Non-cancer cells	Human	Umbilical vein endothelial cells	HUVEC	1–5	Anti-angiogenic	[14]
		Keratinocytes	HaCaT	5 **	Anti-inflammatory	[15]
		Umbilical vein endothelial cells	HUVEC	2.5–5–10 –25–50–100	Anti-angiogenic	[87]
		Lymphatic endothelial cells	HLEC	25–50–100	Anti-angiogenic	[88]

* this concentration corresponds to an extract enriched with fucoxanthin and not pure fucoxanthin (cf. [69]). ** in combination with rosmarinic acid.

In bladder and colon cancer cells, this arrest in the cell cycle is mediated by the upregulation of p21WAF1/Cip1, a cyclin-dependent kinase (CDK)-inhibitory protein [54,57]. The molecular mechanism of cell cycle arrest also involves the downregulation of cyclin D1 and CDK4 complex in B cell malignancies, bladder cancer, melanoma, and HepG2 hepatocarcinoma cell lines [19,54,55,62]. In bladder cancer cells, a decrease of CDK-2 and cyclin E was also observed [54], whereas a decrease of cyclin D2 appears in B cell malignancies and melanoma cells [19,55], and a decreased expression of CDK4, CDK6, and cyclin E could be found in adult T-cell Leukemia [52]. In the HepG2 cell line, Das et al. observed a downregulation of the kinase activity of cyclin D and CDK4 complex, responsible for the phosphorylation of Ser780 of retinoblastoma protein (pRb) [62]. Also, Kim et al. showed a clear lowering of the protein expression of phosphorylated pRb (phospho-pRb), cyclin D1, cyclin D2, and CDK4. They also observed an upregulation of the proteins p27Kip1 and p15INK4B in B16-F10 cells (melanoma) treated with fucoxanthin [55]. In contrast, in colon cancer cell lines, Das et al. have shown that G0/G1 phase arrest was mediated through the increased phosphorylation of pRB and upregulation of p21WAF1/Cip1 but not p27Kip1, and without changes in the protein levels of the D-types of cyclin

and CDK4 [57]. In addition, the study of Satomi et al., using prostate cancer cell lines, suggested that GADD45A and Jun-N-terminal kinase (JNK) might be involved in fucoxanthin-induced G1 cell cycle arrest [58]. Curiously, only one study has reported a fucoxanthin-induced cell cycle arrest in G2/M phase, which was related to a decreased expression of cyclin B1 and survivin in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells [56].

The antiproliferative effect of fucoxanthin was confirmed in vivo by studies showing tumor growth arrest in the presence of fucoxanthin with several types of cancer (Table 3). For example, Mei et al. showed in vivo anti-lung cancer effect of fucoxanthin, and Kim et al. showed that the growth of tumor mass in B16F10 cells-implanted Balb/c mice has been significantly inhibited by the intraperitoneal administration of fucoxanthin [55,67].

Finally, the molecular mechanism that supports the observed G0/G1 phase arrest appears dependent on the cancer cell type but mainly involves cyclin D1 and/or D2 and CDK4 downregulation (Figure 3). However, cyclin E and CDK2 or CDK6 could also be involved in some cell types.

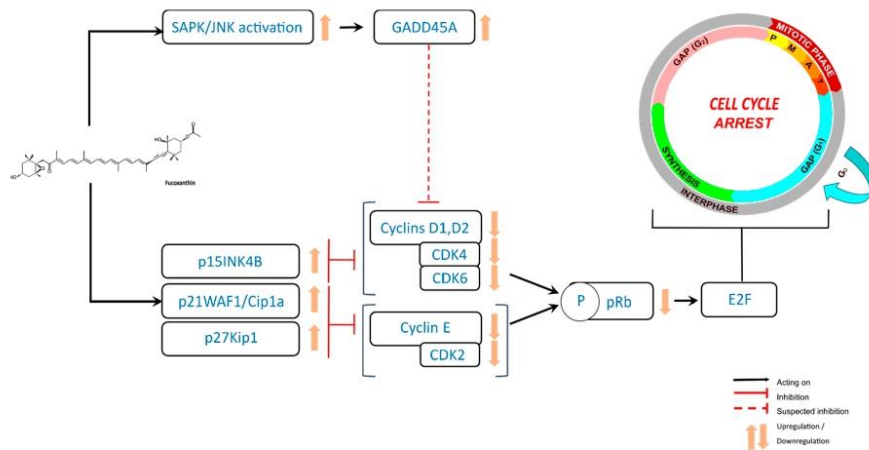


Figure 3. Antiproliferative effects of fucoxanthin through cell cycle arrest in cancer cells.

Table 3. Effects of fucoxanthin and fucoxanthinol effects on in vivo cancer models (mice).

	Context	Dose	Administration	Effects	References	
Fucoxanthin	Lung	Engrafted with A549 cells	5–15–50 mg/kg	Oral	Necrosis	[67]
	Liver	Carcinogenesis model	0.001% in drinking water	Oral	Inhibition of carcinogenesis	[89]
	Duodenal	Carcinogenesis models	0.005% in drinking water	Oral	Inhibition of carcinogenesis	[90]
		Carcinogenesis models	0.005% in drinking water	Oral	Inhibition of carcinogenesis	[91]
	Colorectal	Carcinogenesis models	30 mg/kg	Injection (stomach)	Anoikis	[92]
		Carcinogenesis models	0.01% in drinking water	Oral	Inhibition of carcinogenesis	[93]
	Breast	Engrafted with MDA-MB-231 cells	100 and 500 μ mol/L; 100 μ L/mouse	Injection	Anti-angiogenic	[88]
	Cervix	Engrafted with HeLa cells	10 and 20 mg/kg	Oral	Growth inhibition	[81]
	Lymphoma	Engrafted with B16-F10	150 mg/kg	Oral	Growth inhibition	[53]
	Melanoma	Engrafted with B16-F10	0.1 mg/mouse	Intra-peritoneal injection	Anti-metastasis	[30]
		Carcinogenesis models	200 nM/painting	Topical application (skin painting)	Inhibition of carcinogenesis	[91]
	Sarcoma	Engrafted with S180 cells	50 and 100 mg/kg	Oral	Apoptosis	[94]
		Engrafted with LM8 cells	200 mg/kg	Oral	Growth inhibition	[20]
Glioblastoma	Engrafted with U87 cells	200 mg/kg	Oral	Growth inhibition	[85]	
Fucoxanthinol	Lymphoma	Engrafted with HUT-102 cells	200 mg/kg	Oral	Growth inhibition	[52]
	Sarcoma	Engrafted with LM8 cells	200 mg/kg	Oral	Growth inhibition	[20]

4. Induction of Apoptosis and Autophagy in Cancer Cells

Autophagy and apoptosis are mechanisms involved in the development of a variety of cancers. Fucoxanthin has been highlighted to induce autophagy and apoptosis in cellular cell lines including HeLa, SGC-7901, and human cervical cancer [65,70,83] (Table 2). Anoikis is useful to maintain homeostasis in normal conditions. Anoikis is the name given to induction of apoptosis in cells upon loss of attachment to the extracellular matrix and cellular neighborhood [95]. Cancer cells are resistant to anoikis, favoring metastasis and new tumor growth [95,96]. In order to include fucoxanthin in a potential therapeutic strategy, some pathways have been studied and identified to be involved in those cytotoxic effects.

4.1. Apoptosis

Fucoxanthin inhibited the growth of U251 human glioma cells in a time- and dose-dependent manner by induction of apoptosis with poly-ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage and caspase activation [84]. Furthermore, fucoxanthin treatment of glioma cells caused disturbance of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)-Akt pathways, in a time-dependent manner. This was highlighted by the activation by phosphorylation of Thr183-JNK, Thr180-p38, and Thr202 of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and, in contrast, the inactivation of Akt by phosphorylation of Ser473 [84]. However, the inhibition of reactive oxygen species (ROS) by the antioxidant glutathione counteracts fucoxanthin effects, including the alteration of MAPKs and PI3K-Akt signaling, DNA damage, and cytotoxicity and cell apoptosis. This indicates that ROS production acts as an early apoptotic event and is involved in the fucoxanthin-triggered anticancer mechanism [84].

Results consistent with the data described above were obtained using the human U87 glioma cell line [85]. In the human hepatocarcinoma HepG2 cell line, apoptosis induction by fucoxanthin was correlated to a decreased expression of genes coding antioxidant enzymes superoxide dismutase (*SOD1*, *SOD2*) and catalase (*CAT*) and downregulation of signaling pathways (*AKT*, *JNK*, *ERK1/2*) [69]. The involvement of ROS in fucoxanthin-induced apoptosis was also reported for HL-60 leukemia and fucoxanthin-induced cytotoxicity, and apoptosis was suppressed by the ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) [25]. In HL-60 cells, fucoxanthin induced the cleavage of caspase-3, caspase-7, and PARP, and a decrease of the apoptosis inhibitor Bcl-xL. Moreover, the pre-treatment of cells with NAC prevented these effects of fucoxanthin [25]. In accordance, fucoxanthin increased the apoptosis in human cervical cancer cells, namely HeLa, SiHa, and CaSki cell lines, by targeting the PI3K/Akt/nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway [83]. Fucoxanthin was also shown to synergize with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in human cervical cancer cells [83].

Fucoxanthin also induces apoptosis in human EJ-1 and T24 bladder cancer cell lines [54,75]. In T24 cells, fucoxanthin-induced apoptosis was linked to a decrease in the expression level of mortalin, which is a stress regulator and a member of heat shock protein 70, followed by upregulation of cleaved caspase-3 at a high dose (40 μ M) [54].

Fucoxanthin induced apoptosis of non-small cell lung cancer by modulating expression of p53, p21, Fas, p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA), Bcl-2, and caspase-3/8 [67]. In the B16F10 human melanoma cell line, fucoxanthin-induced apoptosis was associated with the downregulation of Bcl-xL, leading to the sequential activation of caspase-9, caspase-3, and PARP [55]. If most studies report the activation of caspase-3 as a hallmark of fucoxanthin-induced apoptosis, some discrepancies exist about the pro- and anti-apoptotic proteins. For example, fucoxanthin reduced the expression of Bax and Bcl-2 proteins, but not Bcl-xL, in the prostate cancer cell line PC-3 [77], while decreasing Bcl-xL in B16F10 melanoma cells [55]. In contrast, fucoxanthin has no effect on the protein level of Bcl-2, Bcl-xL, or Bax in HL-60 promyelocytic leukemia cells [97]. The decrease of survivin, an apoptosis inhibitory protein, expression was thought to be responsible for the induction of apoptosis by a high dose of fucoxanthin (75 μ M) in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells [56].

Fucoanthin (Table 2) and more importantly its metabolite fucoxanthinol (Table 4) are able to reduce NF- κ B activation and induce apoptosis of the colorectal cancer cell line HCT116, breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231, B-cell malignancies, and primary effusion lymphoma [19,53,78,80,98]. In all these studies, fucoxanthinol was reported to be more potent than its precursor fucoxanthin. This was also observed in the murine macrophages' cell line RAW264.7, where high concentrations of both fucoxanthin and fucoxanthinol (>10 μ M) induced apoptosis with activation of caspase 3/7 and suppression of the anti-apoptotic proteins, such as Bcl-xL and phospho-Akt.

Table 4. In vitro effects of fucoxanthinol on cancer and non-cancer cells.

Cell Type and Origin	Cell Lines	Concentration (μ M)	Effects	References		
Colorectal cancer	Human	DLD-1	1–5	Anoikis	[92]	
		DLD-1	2.5	Anoikis Inhibition of EMT	[99]	
		HCT116	5	Apoptosis	[98]	
		Caco-2	12.5–25	Apoptosis DNA damage	[74]	
		CRC HR29 HCT 116	50	Inhibition of EMT	[99]	
Breast cancer	Human	MCF-7	12.5–25	Apoptosis DNA damage	[74]	
		MCF7 MDA-MB-231	20–30–40	Apoptosis	[80]	
Cancer cells	Human	Raji Daudi Ramos, BJAB L428 KM-H2 HDLM-2 L540	1.25–2.5	Cell cycle arrest (G1; at lower concentration) Apoptosis (at higher concentration)	[19]	
		HHV-8 infected BCBL-1 TY-1	2.5–5	Cell cycle arrest (G1)	[53]	
		MT-2 MT-4 HUT-102 ED-40515(-)	5	Cell cycle arrest (G1) Apoptosis	[52]	
Leukemia	Human	HL-60	6.25–12.5	Apoptosis Antiproliferative DNA Damage	[74]	
Sarcoma	Human	Saos 2	0.63–1.25	Inhibition of migration	[20]	
			0.05–0.1	Inhibition of invasion	[20]	
Non-cancer cells	-	Rat	Aortic ring	2.5–5–10–25	Anti-angiogenic	[87]

Moreover, lower concentrations of fucoxanthin and fucoxanthinol (1–4 μ M) have a cytoprotective effect, inducing nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2/Nrf2) transcription factor and heme oxygenase antioxidant enzyme expression, while a higher concentration activates NFE2L2/Nrf2 and induces apoptosis [100]. In human Saos-2 osteosarcoma cells, fucoxanthin and fucoxanthinol induce apoptosis, at least in part, by inhibiting Akt and activator protein-1 (AP-1) pathways [20]. Apoptosis of fucoxanthinol-treated Saos-2 cells was characterized by a reduced expression of survivin, X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), Bcl-2, and Bcl-xL, and associated with activation of caspases-3, 8, and

9 [20]. A similar pattern was observed in Adult T-cell Leukemia treated by fucoxanthin or fucoxanthinol, which was twice as potent [52]. In addition, fucoxanthinol inhibited the phosphorylation of Akt, phosphoinositide-dependent kinase 1, and the downstream glycogen synthase kinase 3 β , leading to the downregulation of β -catenin [20]. In HL-60 leukemia cells, fucoxanthinol also demonstrated a greater pro-apoptotic effect than fucoxanthin, characterized by a decreased level of Bcl-2 protein [74]. Similarly, a decrease of Bcl-2 protein together with increased DNA fragmentation was observed in CaCo-2 colon cancer cells, which was partially inhibited by a caspase inhibitor Z-VAD-fmk [72]. Effects of fucoxanthin on apoptosis are summarized in Figure 4.

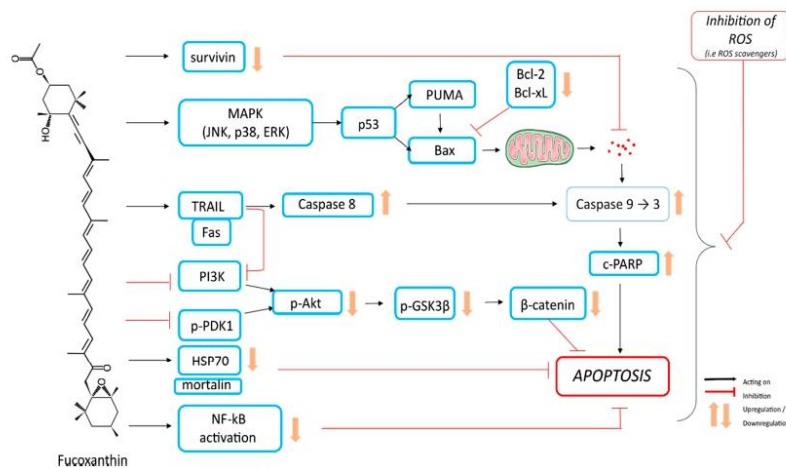


Figure 4. Induction of apoptosis in cancer cells by fucoxanthin.

The in vitro effects of fucoxanthin on cell death are clearly determined and indicate a cytotoxicity, even at low doses, in cancer cell lines. Those effects have also been observed in vivo, in mice bearing xenografted sarcoma 180 (S180). At 50 and 100 mg/kg, fucoxanthin significantly inhibited the growth of sarcoma and induced apoptosis, as demonstrated by the decrease of Bcl-2 expression and a clear increase of cleaved caspase-3 [94]. Moreover, the same authors also reported a clear lowering of survivin, vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor receptor (EGFR), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein expression, and phosphorylated STAT3 level [94].

4.2. Anoikis

A low concentration (2.5 μ M) of the fucoxanthin metabolite fucoxanthinol induced anoikis, i.e., anchorage-dependent apoptosis, through integrin β 1 signal suppression in human DLD-1 colorectal cancer cells [99] (Table 4). The anoikis characteristics were further described in DLD-1 cells as low or null level of integrin β 1, low or null level of phosphorylated focal adhesion kinase (p-FAK-Tyr397), or low or null level of phosphorylated Paxillin (Tyr31), and with a high level of cleaved caspase-3 [92]. In vitro effects (Figure 5) have been confirmed in vivo using an azoxymethane/dextran sodium sulfate carcinogenic mouse model, showing that fucoxanthin ingestion (30 mg/kg body weight) significantly diminished the number and size of polyps compared with untreated control mice and that cells with anoikis features were in colonic crypts significantly increased in fucoxanthin-treated mice [92] (Table 3).

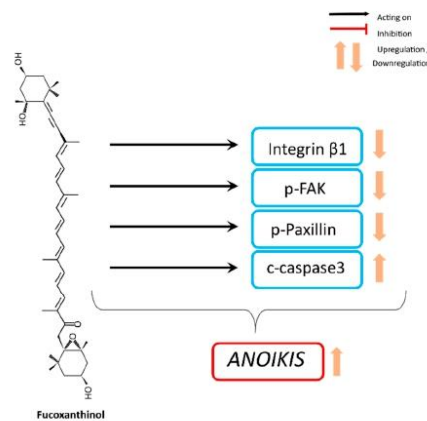


Figure 5. Anoikis induction by fucoxanthinol in cancer cells.

4.3. Autophagy

Treatment of HeLa cells with fucoxanthin (10–80 μM) increased the protein expression of microtubule-associated protein 1A/1B-light-chain 3 (LC3), an autophagosome marker, and Beclin-1, the initiation factor for autophagosome formation [65]. Furthermore, fucoxanthin decreased the levels of phospho-Akt and its downstream proteins p53, p70S6K, and mechanistic target of rapamycin (mTOR) in a dose-dependent manner, and increased the expression of the so-called “phosphatase and tensin homolog” PTEN protein. This suggests that the cytotoxic effect of fucoxanthin is dependent on autophagy in HeLa cells via inhibition of the Akt/mTOR signaling pathway [65]. In gastric cancer SGC7901 cells, fucoxanthin (12.5–50 μM) significantly inhibits the viability of SGC-7901 cells by inducing both autophagy and apoptosis just as effectively, as shown by the downregulation of Bcl-2 and upregulation of Beclin-1, LC3, and cleaved caspase-3. In addition, it appears that fucoxanthin-induced autophagy (Figure 6) occurs prior to apoptosis and may be a promoter of apoptosis [70]. Those two processes are related with each other. Indeed, an increased level of caspase-3 plays a key role in apoptosis.

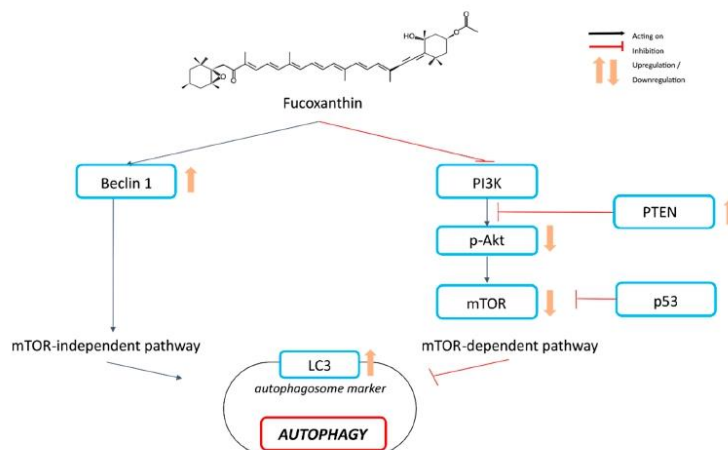


Figure 6. Induction of autophagy in cancer cells by fucoxanthin.

5. Involvement in DNA Damages

Cells are continuously exposed to exogenous and endogenous sources of ROS. The antioxidant properties of fucoxanthin limit ROS-induced DNA damage. Thus, in human fibroblast, Heo and Jeon have shown that high concentrations of fucoxanthin (i.e., 5–250 μM) extracted from the marine algae *Sargassum siliquastrum* decreased the UV B-induced DNA-damage [33]. In cancer cells, fucoxanthin (at 6 μM) displays a protective effect against UV-induced DNA damage, as well as heavy metal and heat-induced protein misfolding and aggregation of proteins, in rat glioma cells [82] (Table 2). In addition, Fucoxanthin from *Sargassum* sp. (20 μM) also shows some protective effects toward bleomycin-induced DNA damage in MCF-7 breast cancer cells [79].

However, under other experimental conditions, fucoxanthin and its metabolites can lead to inducing DNA damages, which can be used for anticancer therapy. Konishi et al. report an augmentation of DNA damage in HL-60 cells from 12.5 and 6.25 μM when cells were treated respectively with fucoxanthin and fucoxanthinol [74] (Table 4). A similar effect was also reported for MCF-7 and Caco-2 cells, and 12.5 μM fucoxanthinol significantly enhances DNA damages, while the same effect was obtained with 25 μM fucoxanthin [74]. These data confirm that once metabolized by the liver, this biomarine compound becomes more active and beneficial for human health within cancer cells. Interestingly, in colon cancer cell lines HCT116 and HT29, fucoxanthin reduced cell viability and induced DNA damage, but without an apparent effect in normal colon cell line CCD-18Co, except at high concentrations (50 and 100 μM). This study also reported that fucoxanthin enhanced the cytotoxic effect of 5-fluoro-uracil in colon cancer cells [73].

In human U51 glioma cells, fucoxanthin was shown to time-dependently induce ROS-mediated DNA damage, as evidenced by the activation of “ataxia-telangiectasia mutated” protein (ATM), “ataxia telangiectasia and Rad3-related” protein (ATR), and p53 by phosphorylation of Ser1981-ATM, Ser428-ATR, and Ser15-p53 respectively, as well as by the phosphorylation of Ser139 of histone H2AX [84]. Moreover, in the human hepatocarcinoma cell line HepG2, fucoxanthin pretreatment (10 μM , 24 h) significantly attenuated cisplatin-induced mRNA expression of DNA repair genes, namely excision repair cross complementation 1 (ERCC1), which is involved in the pathway of DNA nucleotide excision repair and thymidine phosphorylase, a central protein in the pyrimidine nucleoside salvage pathway. Fucoxanthin-modulated mRNA expression leads to improvement of chemotherapeutic efficacy of cisplatin [68]. It is noteworthy that the above-mentioned downregulation of survivin [94] may be linked to the impairment of DNA repair pathways [101,102].

Thus, fucoxanthin may have either a protective or promoting effect with respect to DNA damage depending on the cell types and perhaps the dose used. Further investigations are necessary to identify any impact of fucoxanthin on DNA repair mechanisms.

6. Inhibition of Metastasis-Related Migration, Invasion and Epithelial–Mesenchymal Transition

Metastasis is one of the major fundamental mechanisms of invading cancers [103]. The most destructive forms of cancers infiltrate secondary tissues and can escape the immune response. This allows to replace the tumor microenvironment for metastatic colonization by adapting to supportive niches and surviving as latent tumor-initiating cells [104]. Besides, epithelial–mesenchymal transition (EMT) is one of the most important processes controlling metastasis and is hardly regulated by activation of Wnt/ β -catenin signaling [105]. Many proteins contribute to EMT, such as the mesenchymal structural regulator vimentin, the adhesion/migration marker fibronectin, and the extracellular matrix degrading proteins, i.e., matrix metalloproteinases (MMPs) [106,107].

Fucoxanthin was found to possess strong anticancer and anti-metastatic activities that work irrespective of the p53 status of cancer cells and cause a decrease in hallmark proteins associated with the metastatic spread of cancer cells at doses that were relatively safe to the normal cells [71] (Table 2). The development of osteosarcoma in mice inoculated with osteosarcoma cells was inhibited by a treatment with fucoxanthin [20] (Table 3). Fucoxanthinol, a metabolite of fucoxanthin, inhibited the cell migration and invasion of osteosarcoma cells, and reduced MMP-1 expression and AP-1 signaling [20]

(Figure 7). In addition, fucoxanthinol significantly suppressed sphere-forming activity, migration, and invasion of human colorectal cancer cell lines HT-29 and HCT116 in a dose-dependent manner [99] (Table 4). Moreover, the expression of N-cadherin and vimentin was suppressed by a treatment with 50 μM of fucoxanthinol as well as the activation of integrin signaling linked to EMT inhibition [99]. Fucoxanthin also inhibited the expression and secretion of MMP-9, which plays a critical role in tumor invasion and migration and suppressed invasion of highly metastatic B16-F10 melanoma cells [30], as well as the human glioblastoma cell line U87 [85]. This effect, in glioblastoma cell line U87, is dependent on the p38 MAPK signaling [85]. Furthermore, fucoxanthin decreased the expression of the cell surface glycoprotein CD44 and C-X-C motif chemokine receptor-4 (CXCR4), which are involved in migration, invasion, and adhesion of cancer cells to endothelial cells. Indeed, the adhesion of B16-F10 melanoma cells to the endothelial cells was significantly inhibited by fucoxanthin [30]. Moreover, in vivo metastasis was reduced by fucoxanthin, as shown by a significant reduction of tumor nodules in an experimental lung metastasis in vivo assay [30] and glioblastoma xenografts [85].

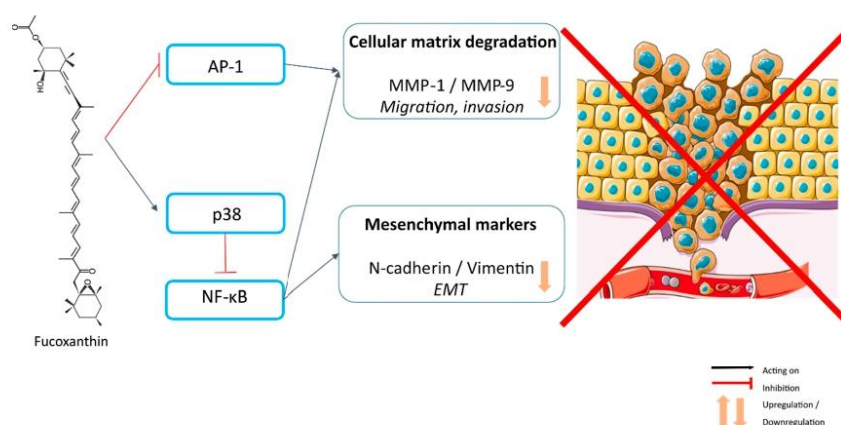


Figure 7. Inhibition of metastasis-related migration, invasion, and epithelial–mesenchymal transition by fucoxanthin.

Taken together, these results show the potential of fucoxanthin in reducing invasion, EMT, and finally, metastasis in some cancer models.

7. Anti-Angiogenic Effect of Fucoxanthin

Angiogenesis could be defined as the process of remodeling the primitive network of blood vessels and its growth into a complex network that is regulated by the balance between pro- and anti-angiogenic molecules. During this process, vascular endothelial cells secrete proteases and then migrate through the extracellular matrix, proliferate, and differentiate into new blood vessels [108]. Pathological angiogenesis is involved in many diseases, including rheumatoid arthritis, atherosclerosis, diabetic retinopathy, and cancer [109]. Angiogenesis is mandatory for tumor progression because newly formed blood vessels are needed to supply oxygen and nutrients, which are essential to the growing tumor, and to remove waste products. During angiogenesis, cancer cells secrete various pro-angiogenic factors such as VEGF, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor 2 (FGF-2) [110]. Also, the metastasis process depends on angiogenesis, as tumor cells migrate from the primary tumor and grow in distant target organs. Few studies highlighted the anti-angiogenic potential of fucoxanthin [14,87,88] (Tables 2 and 3). First, fucoxanthin was shown to inhibit human umbilical vein endothelial cells' (HUVEC) proliferation and tube formation, but without a significant effect on HUVEC chemotaxis [87]. Fucoxanthin (10–20 μM) also suppressed the development of blood

vessel-like structures from CD31-positive cells, and then may suppress the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells involving new blood vessel formation. In addition, fucoxanthin and its derivative fucoxanthinol suppressed, in a dose-dependent manner, micro-vessel outgrowth in an ex vivo angiogenesis assay using a rat aortic ring [87] (Table 4). The molecular mechanism of this anti-angiogenic effect of fucoxanthin involves the downregulation of the mRNA level of FGF-2 and its receptor (FGFR-1) as well as their trans-activation factor, EGR-1, as shown in HUVEC treated by fucoxanthin [14]. Moreover, fucoxanthin downregulates the FGF-2-mediated phosphorylation of signaling proteins such as ERK1/2 and Akt, which leads to the repression of endothelial cells' migration as well as their differentiation into tube-like structures on Matrigel® [14]. Another marine-derived compound, siphonaxanthin, structurally close to fucoxanthin, showed similar effects, causing a dose-dependent inhibition on HUVECs proliferation and tube formation (at concentration of 2.5, 10, and 25 μM). Furthermore, an ex vivo study also indicated the decrease of micro-vessel outgrowth from rat aortic fragments [14].

More recently, Wang et al. used fucoxanthin (25–100 μM) extracted from *Undaria pinnatifida* with human lymphatic endothelial cells (HLEC) and showed inhibition of proliferation, migration, and formation of tube-like structures [88]. In human breast cancer MDA-MB-231 cells, fucoxanthin also suppressed the malignant phenotype and decreased tumor-induced lymphangiogenesis when used in combination with a conditional medium culture system [88]. In vivo, using a MDA-MB-231 nude mouse model of breast cancer, high doses of fucoxanthin (100–500 μM) decreased micro-lymphatic vascular density, suggesting that fucoxanthin inhibits tumor-induced lymphangiogenesis in vitro and in vivo. At the cellular level, the mechanism of action of fucoxanthin involves decreased levels of VEGF-C, VEGF receptor-3, NF- κB , p-Akt, and p-PI3K in HLEC [88].

8. Anti-Inflammatory Effects of Fucoxanthin

Chronic inflammation has been associated with several stages of tumorigenesis, including cellular transformation, promotion, survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis [111–118]. Cells responsible for cancer-associated inflammation are supposed to be genetically stable and poorly subjected to rapid emergence of drug resistance. Targeting inflammation may be an attractive strategy for cancer prevention and therapy [119].

Pro-inflammatory mediators including interleukins, tumor necrosis factor α (TNF α), prostaglandin E2, and nitric oxide contribute to the development of a variety of inflammatory diseases [120]. Natural products such as carotenoids have been used in the prevention of oxidative stress due to their antioxidant activities [120]. Despite the fact that the oxidative or anti-oxidative properties of fucoxanthin are discussed and seem to depend on the cellular context, this compound has been studied in an anti-inflammatory context in vivo and in vitro [121,122].

Ishikawa et al. showed, on adult T-cell leukemia—a fatal malignancy of T lymphocytes caused by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1), that fucoxanthin and fucoxanthinol inhibited cell viability and that the metabolite was twice as potent. Interestingly, uninfected cell lines and normal peripheral blood mononuclear cells were resistant to fucoxanthin and fucoxanthinol [52]. In contrast, other carotenoids, astaxanthin and β -carotene, had mild inhibitory effects on T-cell lines infected by HTLV-1. Otherwise, Lin et al. evaluated the anti-inflammatory effect of *D. salina* carotenoid extract, containing α -carotene and β -carotene on pseudo-rabies virus-infected RAW264.7 cells [123]. They found a downregulation of the expression of pro-inflammatory genes for interleukins (ILs) IL-1 β , IL-6, and TNF α , but also monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in a concentration-dependent manner. This was correlated with a decrease of NF- κB activation by Toll-Like receptor-9, dependent on PI3K/Akt activation [123].

A recent study looked at the effects of the combination of fucoxanthin and rosmarinic acid (a bioactive compound from Lamiaceae plants) on inflammasome regulation. This combination improved anti-inflammatory effects from 5 μM each. Indeed, the inflammatory response is modulated through downregulation of inflammasome components such as “NOD-like receptor family, pyrin

domain containing 3" (NLRP3), "apoptosis-associated speck-like protein" (ASC), caspase-1, and interleukins. These results suggest that fucoxanthin, in combination with rosmarinic acid, exerts anti-inflammatory effects by downregulating NLRP3-inflammasome and increasing the NFE2L2/Nrf2 signaling pathway in UVB-exposed HaCaT keratinocytes [15].

9. Fucoxanthin in Clinical Trials

Despite proven effects in animal studies, there are few clinical trials with pure algal metabolites, limited to those carried out with kahalalide F and fucoxanthin [124]. Most of the current clinical trials are aimed at confirming the effect of algae consumption, as extracts or fractions, on obesity and diabetes, but, to our knowledge, there are no clinical trials involving fucoxanthin in cancer treatment.

In 2008, Asai et al. detected fucoxanthinol at a concentration of 0.8 nM in plasma of individuals after the daily intake of the brown seaweed wakame (*Undaria pinnatifida*) containing 6.1 mg fucoxanthin for 1 week [125]. A 16-week clinical trial with 151 obese women using Xanthigen, a dietary supplement composed of brown seaweed extract containing 2.4 mg of fucoxanthin and pomegranate seed oil, was performed by Abidov et al. [126]. The results confirmed a significant weight loss and reduction of abdominal circumference in subjects whose body mass index (BMI) was over 30 kg/m² [126].

Otherwise, Hashimoto et al. conducted a study on eighteen human volunteers who received an extract of kombu containing 31 mg of fucoxanthin, administered orally. Peripheral blood was collected before and after the treatment and plasma concentrations of fucoxanthinol were measured by high-pressure liquid chromatography, showing that a maximum concentration of 44.2 nM fucoxanthinol was obtained after 4 h. By contrast, the hepatic metabolite of fucoxanthinol, Amarouciaxanthin A, was not present in the volunteers' plasma [127]. In the same context, Mikami et al. developed a simple and reproducible protocol for quantification of fucoxanthinol in human serum using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, which has a high sensitivity and a wide dynamic range. Using capsules of fucoxanthin, prepared by mixing edible brown seaweed (*Sargassum horneri*) oil and medium-chain triglyceride oil, it was confirmed that fucoxanthinol is a major metabolite of fucoxanthin present in human blood. In addition, although fucoxanthin supplementation does not affect visceral fat areas, it may decrease the level of glycated hemoglobin (HbA1c) in individuals carrying the thrifty allele of uncoupling protein-1 (UCP1-3826A/G) [128].

In 2013, Ren et al. investigated whether fucoxanthin or fucoidan (a polysulfated polysaccharide found in various species of brown seaweed), exhibited anti-thrombotic effects [129]. They prepared three types of capsules from the alga *Laminaria japonica*, containing 1 mg fucoxanthin, 400 mg fucoidan, and both, and administered it to 24 volunteers for 5 weeks. The dose of fucoidan or fucoidan + fucoxanthin significantly shortened the lysis time of the thrombus, as measured by a global thrombosis test in the blood, but fucoxanthin did not. Examining the mechanism, dietary fucoidan increased the production of H₂O₂ and the secretion of prostacyclin (PGI₂), a potent inhibitor of platelet aggregation, while fucoidan was below the limit of detection in blood.

Recently, Hitoe and colleagues conducted a clinical trial of fucoxanthin supplementation in Japanese obese subjects [130]. They explored the effect of fucoxanthin (1 or 3 mg daily) in a double-blind placebo-controlled study. Capsules containing fucoxanthin or placebo capsules were administered for 4 weeks to male and female Japanese adults with a BMI of more than 25 kg/m². In accordance with Reference [126], they observed a significant reduction of the relative (ratio versus before treatment) body weight, BMI, and visceral fat area in the 3 mg/day fucoxanthin group compared to the placebo group.

Other clinical trials have been conducted or are still recruiting volunteers to test many hypotheses of clinical effects implicating fucoxanthin, alone or combined with other compounds (Table 5). These studies are listed in the "ClinicalTrials.gov" database [131], a resource provided by the U.S. National Library of Medicine, containing privately and publicly funded clinical studies conducted around the world.

Table 5. Clinical trials involving Fucoxanthin.

NCT Number	Title	Conditions	Interventions	Phases	Study Designs	Start Date	Locations
NCT02875392	Fucoidan Improves the Metabolic Profiles of Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)	Non-alcoholic Fatty Liver Disease	Other: 275 mg Oligo Fucoidan +275 mg HS Fucoxanthin Other: placebo pills	NA (unknown status)	Allocation: Randomized Intervention Model: Parallel Assignment Masking: Double (Participant, Care Provider) Primary Purpose: Treatment	November 2016	WanFangH, Taipei, Taiwan
NCT03625284	Oral Dietary Fucoxanthin-Rich Supplement for Liver Health	Non-Alcoholic Fatty Liver	Dietary Supplement: Placebo Dietary Supplement: FucoVital	NA (unknown status)	Allocation: Randomized Intervention Model: Parallel Assignment Masking: Quadruple (Participant, Care Provider, Investigator, Outcomes Assessor) Primary Purpose: Prevention	10 September 2018	Assaf-Harofeh Medical Center, Israël
NCT03613740	Effect of Fucoxanthin on the Components of the Metabolic Syndrome, Insulin Sensitivity and Insulin Secretion	Metabolic Syndrome	Drug: Fucoxanthin Drug: Placebo	Phase 2 (still recruiting)	Allocation: Randomized Intervention Model: Parallel Assignment Masking: Double (Participant, Investigator) Primary Purpose: Treatment	30 September 2019	Instituto de Terapéutica Experimental y Clínica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Guadalajara, Mexico
NCT04288544	Health Promoting Effects of the Microalgae Phaeodactylum Tricornutum	Human Nutrition, Omega-3 Fatty Acids, Microalgae Micronutrients	Dietary Supplement: Microalgae Dietary Supplement: Omega-3-fatty acid capsule Dietary Supplement: sea fish	NA (Enrolling by invitation)	Allocation: Non-Randomized Intervention Model: Crossover Assignment Masking: None (Open Label) Primary Purpose: Supportive Care	25 February 2020	Iena Stiefvatter, Stuttgart, Germany University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

NA: Not Applicable; NCT: Number Clinical Trials (identifier); Source "ClinicalTrials.gov" database [131].

10. Discussion

The hallmarks of cancer, first described in 2000, comprise six biological capabilities acquired during the multistep development of human tumors: self-sufficiency in growth signals, insensitivity to growth inhibiting signals, the ability to avoid apoptosis and to replicate indefinitely, the induction of angiogenesis, and the ability to form metastases [132]. Later, two distinctive emerging capacities were added, i.e., the deregulation of cellular energy metabolism and the ability to avoid destruction by the immune system, without neglecting two characteristics favoring cancers, i.e., inflammation favoring tumors as well as instability and mutations of the genome [104].

On a structural level, metabolites of fucoxanthin are fucoxanthinol, which has been found to be more efficient than fucoxanthin, and amarouciaxanthin A [46]. Curiously, to our knowledge, the effects of amarouciaxanthin A on cancer prevention and therapy have not been clarified yet. However, considering those hallmarks, fucoxanthin and its derivatives appears to be a promising bioactive compound for treatment of cancer development and aggressiveness. Nonetheless, a few points need to be deepened, such as genomic instability through deregulation of DNA repair pathways, which can initiate cancer and finally result in resistance to chemo- and radio-therapy. It may be useful to study whether fucoxanthin has an inhibitory effect on DNA repair pathways, such as nucleotide excision repair, mismatch repair, and double-strand break repairs, which are involved in cancer therapy resistance [133,134].

Moreover, concerning angiogenesis, despite promising results showing that fucoxanthin downregulates the phosphorylation of FGF-2 and also involves decreased levels of VEGF-C, VEGF receptor-3, NF- κ B, phospho-Akt, and phospho-PI3K in HLEC [88], further studies could elucidate the exact molecular mechanisms underlying the anti-angiogenic effect of fucoxanthin, especially those related to VEGF and FGF-2. This should lead to enhance the exploration of therapeutic potential of marine-derived molecules such as fucoxanthin. Indeed, angiogenesis is recognized as one of the hallmarks of cancer, a crucial step in the transition of tumors from a dormant stage to a malignant stage, and playing an essential role in tumor growth, invasion, and metastasis [104]. Key proteins implicated in the regulation of cellular adhesion, migration, and EMT are, for the most part, inhibited by fucoxanthin or its metabolite fucoxanthinol [20,99].

The role of fucoxanthin in the ability of tumor cells to deregulate cellular energy production, known as the “Warburg effect”, remains to be explored. It is described as the increased utilization of glycolysis rather than oxidative phosphorylation by cancer cells because of their energy requirement under normal oxygen conditions [135]. Zeaxanthin, another carotenoid, which is structurally similar to fucoxanthin, was shown to block hypoxia-induced VEGF secretion in cultured human retinal pigment epithelial cells and seems to modulate hypoxia-inducible factors-1 (HIF-1), which has been recognized as an important cancer drug target [136]. Extensive studies are necessary to complete potential inhibitory effects of fucoxanthin on the Warburg effect but also on two other hallmarks: enabling replicative immortality and the capacity of cancer cells to avoid immune destruction.

Fucoxanthin and more importantly its metabolite fucoxanthinol are able to reduce NF- κ B activation [19,53,78,80,98], which favor apoptosis. NF- κ B is also implicated in inflammation, which promotes cell proliferation and is linked to carcinogenesis. Indeed, inflammatory responses play decisive roles at different stages of tumor development [104]. Interestingly, Lin et al. found that *D. salina* carotenoids extract induced a downregulation of the expression of pro-inflammatory genes and a decrease of NF- κ B activation in an antiviral context [123]. In addition, a few studies highlighted the anti-inflammatory potential of fucoxanthin in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation [25,137]. In vivo, fucoxanthin was also found to decrease the expression of inflammatory cytokines in a prophylactic manner in the LPS-induced sepsis mouse model [42]. Furthermore, in combination with rosmarinic acid, fucoxanthin seems to exert anti-inflammatory effects by downregulating NLRP3-inflammasome and increasing the NFE2L2/Nrf2 signaling pathway [15]. However, further investigations are necessary to evaluate more precisely the anti-inflammatory effects of fucoxanthin in bacterial and especially viral infection, as well as its involvement in tumor progression.

The knowledge of the correlation between inflammation and tumor development should give the opportunity of developing new candidates for therapeutics. This could be used in combination with conventional therapeutic approaches, such as chemotherapy, radiotherapy, and targeted therapy [138]. Current findings suggest that fucoxanthin and its derived compounds could be effective for anticancer treatment and these carotenoids could be useful to support therapeutic strategies in combination with common cancer drugs. As described above (Section 5), fucoxanthin leads to improvement of the chemotherapeutic efficacy of cisplatin by targeting the DNA repair pathway [68]. Furthermore, fucoxanthin has been shown to act in synergy with other conventional drugs, such as troglitazone, a specific ligand for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma. Both drugs had a cytotoxic effect on Caco-2 cells while its separated administration had no effects [72]. In the same way, Ye et al. demonstrated that the use of a combined treatment with fucoxanthin and TRAIL could be a useful strategy against TRAIL-resistant cervical cancer by acting on the upregulation of the PI3K/Akt pathway [83,139]. Furthermore, Eid et al. also showed that fucoxanthin enhanced, synergistically, cytotoxicity induced by doxorubicin in human colorectal adenocarcinoma cells, by inhibiting the function of the ATP-Binding Cassette transporters [140]. These studies led to suggest that these biomolecules could be effective for cancer therapy as chemosensitizers, adjuvants, or even as active substances.

11. Conclusions

Cellular and animal studies have shown that fucoxanthin has anticancer effects. However, investigation of this role in humans is lacking. Clinical trials are required to assess the effect of fucoxanthin in close connection with the study of the mechanisms involved in the antitumoral action of fucoxanthin. Moreover, anticancer effects of fucoxanthin are regulated by several mechanisms leading to cell cycle arrest, induction of cell death and DNA damages, inhibition of metastasis-related migration, invasion and epithelial–mesenchymal transition, anti-angiogenic, and anti-inflammatory effects. Furthermore, combined treatments of fucoxanthin or fucoxanthinol with usual anticancer treatments can support conventional therapeutic strategies by reducing drug resistance. Indeed, as an anticancer molecule, fucoxanthinol appears to be a more effective bioactive compound than fucoxanthin. Therefore, the potential use of fucoxanthinol and other fucoxanthin derivatives (such as apo-9'-fucoxanthinone and apo-13-fucoxanthinone) as co-adjuvant agents in the treatment of cancer should be further investigated. However, further studies are necessary for precise and complete inhibitory effects of fucoxanthin and its derivatives, but regarding these hallmarks, fucoxanthin appears to be a promising compound for cancer therapy.

Author Contributions: All authors contributed equally to writing—review and editing, and have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ligue contre le Cancer, comité de la Sarthe, grant IRAPIM.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

AP-1	activator protein-1
ASC	apoptosis-associated speck-like protein
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BMI	body mass index
CAT	catalase

Table 2. In vitro effects of fucoxanthin on cancer and non-cancer cells.

Cell Type and Origin		Cell Lines	Concentration (µM)	Effects	References	
Cancer cells	Lung	Human	NSCLC-N6 A549	7.6–60.7	Apoptosis	[66]
			A549 H1299	12.5–25–50	Cell cycle arrest (G0/G1 mainly + S)	[67]
			HepG2	1–10	Apoptosis	[68]
	Liver	Human	SK-Hep-1	1–20	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[64]
			HepG2	3.8–5.5	Cell cycle arrest (G1)	[59]
			HepG2	25	Cell cycle arrest (G0/G1)	[62]
			HepG2	~20 µg/mL *	Apoptosis	[69]
	Gastric	Human	SGC-7901	12.5–25–50	Apoptosis/Autophagy	[70]
			MGC-803	50–75	Cell cycle arrest (G2/M) Apoptosis	[56]
	Colorectal	Human	DLD-1 cells	5	Inhibition of epithelial–mesenchymal transition (EMT)	[71]
			Caco-2	7.6	Apoptosis	[72]
			HCT116 HT29	10–50–100	DNA damage	[73]
			WiDr	25–50	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[57]
			Caco-2	25	Apoptosis DNA damage	[74]
	Bladder	Human	T24	5–10	Cell cycle arrest (G0/G1) Apoptosis	[54]
			EJ-1	20	Apoptosis	[75]
	Prostate	Human	DU145 LNCap	3.8–5.5	Cell cycle arrest (G1)	[58,59]
			PC-3 DU145 LNCap	20	Apoptosis	[76]
			PC-3	20	Apoptosis	[77]
	Breast	Human	MCF 7 MD-MB-231	10	Apoptosis	[78]
MCF 7			20	Protect against DNA damage	[79]	
MCF 7 MD-MB-231			20–30–40	Apoptosis	[80]	
MCF 7			25	Apoptosis/DNA damage	[74]	
Cervix	Human	HeLa	0.5	Apoptosis	[81]	
		Rat	C6	6	Protect against DNA damage	[82]
	Human	HeLa	10–20–40	Cell cycle arrest (G0/G1)	[65]	
		SiHa	20	Apoptosis	[83]	
Neural	Human	GOTO	7.6–15.2	G0/G1 arrest	[61]	
		U251	20	Apoptosis	[84]	
		U251/U87	25–50	Apoptosis/Inhibition of migration and invasion	[85]	

7. Bonnett, R.; Mallams, A.K.; Tee, J.L.; Weedon, B.C.L.; McCormick, A. Fucoxanthin and related pigments. *Chem. Commun. Lond.* **1966**, 515. [[CrossRef](#)]
8. Bonnett, R.; Mallams, A.K.; Spark, A.A.; Tee, J.L.; Weedon, B.C.L.; McCormick, A. Carotenoids and related compounds. Part XX. Structure and reactions of fucoxanthin. *J. Chem. Soc. C Org.* **1969**, 429. [[CrossRef](#)]
9. Takaichi, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1101–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Liaaen-Jensen, S. Marine Carotenoids. In *Marine Natural Products*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1978; pp. 1–73. ISBN 978-0-12-624002-3.
11. Kim, S.M.; Jung, Y.-J.; Kwon, O.-N.; Cha, K.H.; Um, B.-H.; Chung, D.; Pan, C.-H. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *166*, 1843–1855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Funayama, K.; Miyashita, K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *332*, 392–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Miyashita, K. Dietary Combination of Fucoxanthin and Fish Oil Attenuates the Weight Gain of White Adipose Tissue and Decreases Blood Glucose in Obese/Diabetic KK-*A* ν Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7701–7706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ganesan, P.; Matsubara, K.; Sugawara, T.; Hirata, T. Marine algal carotenoids inhibit angiogenesis by down-regulating FGF-2-mediated intracellular signals in vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *380*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rodriguez-Luna, A.; Ávila-Román, J.; Oliveira, H.; Motilva, V.; Talero, E. Fucoxanthin and Rosmarinic Acid Combination Has Anti-Inflammatory Effects through Regulation of NLRP3 Inflammasome in UVB-Exposed HaCaT Keratinocytes. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hwang, P.-A.; Phan, N.N.; Lu, W.-J.; Ngoc Hieu, B.T.; Lin, Y.-C. Low-molecular-weight fucoidan and high-stability fucoxanthin from brown seaweed exert prebiotics and anti-inflammatory activities in Caco-2 cells. *Food Nutr. Res.* **2016**, *60*, 32033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Mayer, C.; Côme, M.; Ulmann, L.; Chini Zittelli, G.; Faraloni, C.; Nazih, H.; Ouguerram, K.; Chénais, B.; Mimouni, V. Preventive Effects of the Marine Microalga *Phaeodactylum tricornutum*, Used as a Food Supplement, on Risk Factors Associated with Metabolic Syndrome in Wistar Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 1069. [[CrossRef](#)]
18. Airanthi, M.K.W.-A.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Comparative Antioxidant Activity of Edible Japanese Brown Seaweeds. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C104–C111. [[CrossRef](#)]
19. Tafuku, S.; Ishikawa, C.; Yasumoto, T.; Mori, N. Anti-neoplastic effects of fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on Burkitt's and Hodgkin's lymphoma cells. *Oncol. Rep.* **2012**, *28*, 1512–1518. [[CrossRef](#)]
20. Rokkaku, T.; Kimura, R.; Ishikawa, C.; Yasumoto, T.; Senba, M.; Kanaya, E.; Mori, N. Anticancer effects of marine carotenoids, fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on osteosarcoma. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1176–1186. [[CrossRef](#)]
21. Heo, S.-J.; Yoon, W.-J.; Kim, K.-N.; Ahn, G.-N.; Kang, S.-M.; Kang, D.-H.; Affan, A.; Oh, C.; Jung, W.-K.; Jeon, Y.-J. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2045–2051. [[CrossRef](#)]
22. Kim, S.M.; Kang, S.-W.; Kwon, O.-N.; Chung, D.; Pan, C.-H. Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2012**, *55*, 477–483. [[CrossRef](#)]
23. Imbs, T.I.; Ermakova, S.P.; Fedoreyev, S.A.; Anastuyk, S.D.; Zvyagintseva, T.N. Isolation of Fucoxanthin and Highly Unsaturated Monogalactosyldiacylglycerol from Brown Alga *Fucus evanescens* C Agardh and In Vitro Investigation of Their Antitumor Activity. *Mar. Biotechnol.* **2013**, *15*, 606–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zaragoza, M.C.; López, D.; Sáiz, P.M.; Poquet, M.; Pérez, J.; Puig-Parellada, P.; Marmol, F.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Lerat, Y.; et al. Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7773–7780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim, K.-N.; Heo, S.-J.; Kang, S.-M.; Ahn, G.; Jeon, Y.-J. Fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through a ROS-mediated Bcl-xL pathway. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 1648–1654. [[CrossRef](#)]

26. Kanazawa, K.; Ozaki, Y.; Hashimoto, T.; Das, S.K.; Matsushita, S.; Hirano, M.; Okada, T.; Komoto, A.; Mori, N.; Nakatsuka, M. Commercial-scale Preparation of Biofunctional Fucoxanthin from Waste Parts of Brown Sea Algae *Laminalia japonica*. *Food Sci. Technol. Res.* **2008**, *14*, 573–582. [[CrossRef](#)]
27. Xiao, X.; Si, X.; Yuan, Z.; Xu, X.; Li, G. Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography: Other Techniques. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 2313–2317. [[CrossRef](#)]
28. Sangeetha, R.K.; Bhaskar, N.; Divakar, S.; Baskaran, V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: Structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *333*, 299–310. [[CrossRef](#)]
29. Mori, K.; Ooi, T.; Hiraoka, M.; Oka, N.; Hamada, H.; Tamura, M.; Kusumi, T. Fucoxanthin and Its Metabolites in Edible Brown Algae Cultivated in Deep Seawater. *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 63–72. [[CrossRef](#)]
30. Chung, T.-W.; Choi, H.-J.; Lee, J.-Y.; Jeong, H.-S.; Kim, C.-H.; Joo, M.; Choi, J.-Y.; Han, C.-W.; Kim, S.-Y.; Choi, J.-S.; et al. Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *439*, 580–585. [[CrossRef](#)]
31. Jaswir, I.; Noviendri, D.; Salleh, H.M.; Miyashita, K. Fucoxanthin Extractions of Brown Seaweeds and Analysis of Their Lipid Fraction in Methanol. *Food Sci. Technol. Res.* **2012**, *18*, 251–257. [[CrossRef](#)]
32. Nagappan, H.; Pee, P.P.; Kee, S.H.Y.; Ow, J.T.; Yan, S.W.; Chew, L.Y.; Kong, K.W. Malaysian brown seaweeds *Sargassum siliquosum* and *Sargassum polycystum*: Low density lipoprotein (LDL) oxidation, angiotensin converting enzyme (ACE), α -amylase, and α -glucosidase inhibition activities. *Food Res. Int. Off. Ont.* **2017**, *99*, 950–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Heo, S.-J.; Jeon, Y.-J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *95*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Heo, S.-J.; Yoon, W.-J.; Kim, K.-N.; Oh, C.; Choi, Y.-U.; Yoon, K.-T.; Kang, D.-H.; Qian, Z.-J.; Choi, I.-W.; Jung, W.-K. Anti-inflammatory effect of fucoxanthin derivatives isolated from *Sargassum siliquastrum* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2012**, *50*, 3336–3342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Maeda, H.; Fukuda, S.; Izumi, H.; Saga, N. Anti-Oxidant and Fucoxanthin Contents of Brown Alga *Ishimozuku* (*Sphaerotrichia divaricata*) from the West Coast of Aomori, Japan. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Nurrochmad, A.; Wirasti, W.; Dirman, A.; Lukitaningsih, E.; Rahmawati, A.; Fakhrudin, N. Effects of Antioxidant, Anti-Collagenase, Anti-Elastase, Anti-Tyrosinase of The Extract and Fraction From *Turbinaria decurrens* Bory. *Indones. J. Pharm.* **2018**, *29*, 188. [[CrossRef](#)]
37. Petrushkina, M.; Gusev, E.; Sorokin, B.; Zotko, N.; Mamaeva, A.; Filimonova, A.; Kulikovskiy, M.; Maltsev, Y.; Yampolsky, I.; Guglya, E.; et al. Fucoxanthin production by heterokont microalgae. *Algal Res.* **2017**, *24*, 387–393. [[CrossRef](#)]
38. Allen, M.B.; Goodwin, T.W.; Phagpolngarm, S. Carotenoid Distribution in Certain Naturally Occurring Algae and in some Artificially Induced Mutants of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Gen. Microbiol.* **1960**, *23*, 93–103. [[CrossRef](#)]
39. Withers, N.W.; Fiksdahl, A.; Tuttle, R.C.; Liaaen-Jensen, S. Carotenoids of the chrysophyceae. *Comp. Biochem. Physiol. Part. B Comp. Biochem.* **1981**, *68*, 345–349. [[CrossRef](#)]
40. Foo, S.C.; Md. Yusoff, F.; Ismail, M.; Basri, M.; Chan, K.W.; Khong, N.M.H.; Yau, S.K. Production of fucoxanthin-rich fraction (FxRF) from a diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Algal Res.* **2015**, *12*, 26–32. [[CrossRef](#)]
41. Xia, S.; Wang, K.; Wan, L.; Li, A.; Hu, Q.; Zhang, C. Production, Characterization, and Antioxidant Activity of Fucoxanthin from the Marine Diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2667–2681. [[CrossRef](#)]
42. Su, J.; Guo, K.; Huang, M.; Liu, Y.; Zhang, J.; Sun, L.; Li, D.; Pang, K.-L.; Wang, G.; Chen, L.; et al. Fucoxanthin, a Marine Xanthophyll Isolated From *Corticaria weissflogii* ND-8: Preventive Anti-Inflammatory Effect in a Mouse Model of Sepsis. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 906. [[CrossRef](#)]
43. Crupi, P.; Toci, A.T.; Mangini, S.; Wrubl, F.; Rodolfi, L.; Tredici, M.R.; Coletta, A.; Antonacci, D. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (*Isochrysis* sp.) by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector multistage mass spectrometry coupled with positive electrospray ionization: Fucoxanthin isomers in *Isochrysis* sp. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1027–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Pasquet, V.; Chérouvrier, J.-R.; Farhat, F.; Thiéry, V.; Piot, J.-M.; Bérard, J.-B.; Kaas, R.; Serive, B.; Patrice, T.; Cadoret, J.-P.; et al. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process. Biochem.* **2011**, *46*, 59–67. [[CrossRef](#)]
45. Sugawara, T.; Baskaran, V.; Tsuzuki, W.; Nagao, A. Brown Algae Fucoxanthin Is Hydrolyzed to Fucoxanthinol during Absorption by Caco-2 Human Intestinal Cells and Mice. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 946–951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Asai, A.; Sugawara, T.; Ono, H.; Nagao, A. Biotransformation of Fucoxanthinol into Amarouciaxanthin in mice and HepG2 cells: Formation and cytotoxicity of Fucoxanthin metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 205–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Komba, S.; Kotake-Nara, E.; Tsuzuki, W. Degradation of Fucoxanthin to Elucidate the Relationship between the Fucoxanthin Molecular Structure and Its Antiproliferative Effect on Caco-2 Cells. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Doi, Y.; Ishibashi, M.; Yamaguchi, N.; Kobayashi, J. Isolation of Apo-9'-fucoxanthinone from the Cultured Marine Dinoflagellate Amphidinium sp. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1097–1099. [[CrossRef](#)]
49. Shaw, B.A.; Andersen, R.J.; Harrison, P.J. Feeding deterrence properties of apo-fucoxanthinoids from marine diatoms. I. Chemical structures of apo-fucoxanthinoids produced by *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.* **1995**, *124*, 467–472. [[CrossRef](#)]
50. Beppe, F.; Niwano, Y.; Tsukui, T.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *J. Toxicol. Sci.* **2009**, *34*, 501–510. [[CrossRef](#)]
51. Almeida, T.P.; Ferreira, J.; Vettorazzi, A.; Azqueta, A.; Rocha, E.; Ramos, A.A. Cytotoxic activity of fucoxanthin, alone and in combination with the cancer drugs imatinib and doxorubicin, in CML cell lines. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *59*, 24–33. [[CrossRef](#)]
52. Ishikawa, C.; Tafuku, S.; Kadokaru, T.; Sawada, S.; Tomita, M.; Okudaira, T.; Nakazato, T.; Toda, T.; Uchiyama, J.-N.; Taira, N.; et al. Anti-adult T-cell leukemia effects of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 2702–2712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yamamoto, K.; Ishikawa, C.; Katano, H.; Yasumoto, T.; Mori, N. Fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, induce apoptosis of primary effusion lymphomas. *Cancer Lett.* **2011**, *300*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, L.; Zeng, Y.; Liu, Y.; Hu, X.; Li, S.; Wang, Y.; Li, L.; Lei, Z.; Zhang, Z. Fucoxanthin induces growth arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells by up-regulation of p21 and down-regulation of mortalin. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2014**, *46*, 877–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kim, K.-N.; Ahn, G.; Heo, S.-J.; Kang, S.-M.; Kang, M.-C.; Yang, H.-M.; Kim, D.; Roh, S.W.; Kim, S.-K.; Jeon, B.-T.; et al. Inhibition of tumor growth in vitro and in vivo by fucoxanthin against melanoma B16F10 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**, *35*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yu, R.-X.; Hu, X.-M.; Xu, S.-Q.; Jiang, Z.-J.; Yang, W. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *657*, 10–19. [[CrossRef](#)]
57. Das, S.K.; Hashimoto, T.; Shimizu, K.; Yoshida, T.; Sakai, T.; Sowa, Y.; Komoto, A.; Kanazawa, K. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* **2005**, *1726*, 328–335. [[CrossRef](#)]
58. Satomi, Y. Fucoxanthin induces GADD45A expression and G1 arrest with SAPK/JNK activation in LNCap human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 807–813.
59. Satomi, Y.; Nishino, H. Implication of mitogen-activated protein kinase in the induction of G1 cell cycle arrest and gadd45 expression by the carotenoid fucoxanthin in human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 260–266. [[CrossRef](#)]
60. Yoshiko, S.; Hoyoku, N. Fucoxanthin, a natural carotenoid, induces G1 arrest and GADD45 gene expression in human cancer cells. *In Vivo Athens Greece* **2007**, *21*, 305–309.
61. Okuzumi, J.; Nishino, H.; Murakoshi, M.; Iwashima, A.; Tanaka, Y.; Yamane, T.; Fujita, Y.; Takahashi, T. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Lett.* **1990**, *55*, 75–81. [[CrossRef](#)]
62. Das, S.K.; Hashimoto, T.; Kanazawa, K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 743–749. [[CrossRef](#)]

63. Neumann, U.; Derwenskus, F.; Flaiz Flister, V.; Schmid-Staiger, U.; Hirth, T.; Bischoff, S. Fucoxanthin, A Carotenoid Derived from *Phaeodactylum tricornutum* Exerts Antiproliferative and Antioxidant Activities in Vitro. *Antioxidants* **2019**, *8*, 183. [\[CrossRef\]](#)
64. Liu, C.-L.; Huang, Y.-S.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.; Hu, M.-L. Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *182*, 165–172. [\[CrossRef\]](#)
65. Hou, L.; Gao, C.; Chen, L.; Hu, G.; Xie, S. Essential role of autophagy in fucoxanthin-induced cytotoxicity to human epithelial cervical cancer HeLa cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*, 1403–1410. [\[CrossRef\]](#)
66. Moreau, D.; Tomasoni, C.; Jacquot, C.; Kaas, R.; Le Guedes, R.; Cadoret, J.-P.; Muller-Feuga, A.; Kontiza, I.; Vagias, C.; Roussis, V.; et al. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *22*, 97–103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Mei, C.; Zhou, S.; Zhu, L.; Ming, J.; Zeng, F.; Xu, R. Antitumor Effects of Laminaria Extract Fucoxanthin on Lung Cancer. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 39. [\[CrossRef\]](#)
68. Liu, C.-L.; Lim, Y.-P.; Hu, M.-L. Fucoxanthin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via NFκB-mediated pathway and downregulates DNA repair gene expression in human hepatoma HepG2 cells. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 50–66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Foo, S.C.; Md. Yusoff, F.; Imam, M.U.; Foo, J.B.; Ismail, N.; Azmi, N.H.; Tor, Y.S.; Khong, N.M.H.; Ismail, M. Increased fucoxanthin in *Chaetoceros calcitrans* extract exacerbates apoptosis in liver cancer cells via multiple targeted cellular pathways. *Biotechnol. Rep.* **2019**, *21*, e00296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Zhu, Y.; Cheng, J.; Min, Z.; Yin, T.; Zhang, R.; Zhang, W.; Hu, L.; Cui, Z.; Gao, C.; Xu, S.; et al. Effects of fucoxanthin on autophagy and apoptosis in SGC-7901 cells and the mechanism. *J. Cell. Biochem.* **2018**, *119*, 7274–7284. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Garg, S.; Afzal, S.; Elwakeel, A.; Sharma, D.; Radhakrishnan, N.; Dhanjal, J.K.; Sundar, D.; Kaul, S.C.; Wadhwa, R. Marine Carotenoid Fucoxanthin Possesses Anti-Metastasis Activity: Molecular Evidence. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 338. [\[CrossRef\]](#)
72. Hosokawa, M.; Kudo, M.; Maeda, H.; Kohno, H.; Tanaka, T.; Miyashita, K. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARγ ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* **2004**, *1675*, 113–119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Lopes-Costa, E.; Abreu, M.; Gargiulo, D.; Rocha, E.; Ramos, A.A. Anticancer effects of seaweed compounds fucoxanthin and phloroglucinol, alone and in combination with 5-fluorouracil in colon cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2017**, *80*, 776–787. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Konishi, I.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Kobayashi, H.; Miyashita, K. Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *142*, 53–59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Zhang, Z.; Zhang, P.; Hamada, M.; Takahashi, S.; Xing, G.; Liu, J.; Sugiura, N. Potential chemoprevention effect of dietary fucoxanthin on urinary bladder cancer EJ-1 cell line. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 1099–1103. [\[CrossRef\]](#)
76. Kotake-Nara, E.; Kushiro, M.; Zhang, H.; Sugawara, T.; Miyashita, K.; Nagao, A. Carotenoids Affect Proliferation of Human Prostate Cancer Cells. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 3303–3306. [\[CrossRef\]](#)
77. Kotake-Nara, E.; Sugawara, T.; Nagao, A. Antiproliferative effect of neoxanthin and fucoxanthin on cultured cells. *Fish. Sci.* **2005**, *71*, 459–461. [\[CrossRef\]](#)
78. Rwigemera, A.; Mamelona, J.; Martin, L.J. Comparative Effects between Fucoxanthinol and its Precursor Fucoxanthin on Viability and Apoptosis of Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-23. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 207–219.
79. Ayyad, S.-E.; Basaif, S.; Badria, A.; Ezmirly, S.; Alarif, W.; Badria, F. Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum* sp. *Pharmacogn. Res.* **2011**, *3*, 160. [\[CrossRef\]](#)
80. Rwigemera, A.; Mamelona, J.; Martin, L.J. Inhibitory effects of fucoxanthinol on the viability of human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 are correlated with modulation of the NF-kappaB pathway. *Cell Biol. Toxicol.* **2014**, *30*, 157–167. [\[CrossRef\]](#)
81. Ye, G.; Lu, Q.; Zhao, W.; Du, D.; Jin, L.; Liu, Y. Fucoxanthin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa via PI3K/Akt pathway. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 11261–11267. [\[CrossRef\]](#)

82. Afzal, S.; Garg, S.; Ishida, Y.; Terao, K.; Kaul, S.; Wadhwa, R. Rat Glioma Cell-Based Functional Characterization of Anti-Stress and Protein Deaggregation Activities in the Marine Carotenoids, Astaxanthin and Fucoxanthin. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Jin, Y.; Qiu, S.; Shao, N.; Zheng, J. Fucoxanthin and Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Synergistically Promotes Apoptosis of Human Cervical Cancer Cells by Targeting PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 11–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Wu, H.; Fu, X.; Cao, W.; Xiang, W.; Hou, Y.; Ma, J.; Wang, Y.; Fan, C. Induction of Apoptosis in Human Glioma Cells by Fucoxanthin via Triggering of ROS-Mediated Oxidative Damage and Regulation of MAPKs and PI3K–AKT Pathways. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 2212–2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Liu, Y.; Zheng, J.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Yang, Y.; Bai, M.; Dai, Y. Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 2728–2751. [[CrossRef](#)]
86. Ganesan, P.; Noda, K.; Manabe, Y.; Ohkubo, T.; Tanaka, Y.; Maoka, T.; Sugawara, T.; Hirata, T. Siphonaxanthin, a marine carotenoid from green algae, effectively induces apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1810*, 497–503. [[CrossRef](#)]
87. Sugawara, T.; Matsubara, K.; Akagi, R.; Mori, M.; Hirata, T. Antiangiogenic Activity of Brown Algae Fucoxanthin and Its Deacetylated Product, Fucoxanthinol. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9805–9810. [[CrossRef](#)]
88. Wang, J.; Ma, Y.; Yang, J.; Jin, L.; Gao, Z.; Xue, L.; Hou, L.; Sui, L.; Liu, J.; Zou, X. Fucoxanthin inhibits tumour-related lymphangiogenesis and growth of breast cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 2219–2229. [[CrossRef](#)]
89. Nishino, H. Cancer prevention by carotenoids. *Mutat. Res.* **1998**, *402*, 159–163. [[CrossRef](#)]
90. Okuzumi, J.; Takahashi, T.; Yamane, T.; Kitao, Y.; Inagake, M.; Ohya, K.; Nishino, H.; Tanaka, Y. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Lett.* **1993**, *68*, 159–168. [[CrossRef](#)]
91. Nishino, H. Cancer chemoprevention by natural carotenoids and their related compounds. *J. Cell. Biochem.* **1995**, *59*, 231–235. [[CrossRef](#)]
92. Terasaki, M.; Iida, T.; Kikuchi, F.; Tamura, K.; Endo, T.; Kuramitsu, Y.; Tanaka, T.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M. Fucoxanthin potentiates anoikis in colon mucosa and prevents carcinogenesis in AOM/DSS model mice. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *64*, 198–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Kim, J. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 81–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wang, J.; Chen, S.; Xu, S.; Yu, X.; Ma, D.; Hu, X.; Cao, X. In vivo induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid, associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2055–2068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Fung, C.; Lock, R.; Gao, S.; Salas, E.; Debnath, J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 797–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Reddig, P.J.; Juliano, R.L. Clinging to life: Cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev.* **2005**, *24*, 425–439. [[CrossRef](#)]
97. Kotake-Nara, E.; Terasaki, M.; Nagao, A. Characterization of Apoptosis Induced by Fucoxanthin in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 224–227. [[CrossRef](#)]
98. Tamura, S.; Narita, T.; Fujii, G.; Miyamoto, S.; Hamoya, T.; Kurokawa, Y.; Takahashi, M.; Miki, K.; Matsuzawa, Y.; Komiya, M.; et al. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity enhances fucoxanthinol-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Genes Environ.* **2019**, *41*, 1. [[CrossRef](#)]
99. Terasaki, M.; Maeda, H.; Miyashita, K.; Mutoh, M. Induction of Anoikis in Human Colorectal Cancer Cells by Fucoxanthinol. *Nutr. Cancer* **2017**, *69*, 1043–1052. [[CrossRef](#)]
100. Taira, J.; Sonamoto, M.; Uehara, M. Dual Biological Functions of a Cytoprotective Effect and Apoptosis Induction by Bioavailable Marine Carotenoid Fucoxanthinol through Modulation of the Nrf2 Activation in RAW264.7 Macrophage Cells. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 305. [[CrossRef](#)]
101. Tomacic, M.T.; Kaina, B. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta BBA Rev. Cancer* **2013**, *1835*, 11–27. [[CrossRef](#)]

102. Lin, T.-Y.; Chan, H.-H.; Chen, S.-H.; Sarvagalla, S.; Chen, P.-S.; Coumar, M.S.; Cheng, S.M.; Chang, Y.-C.; Lin, C.-H.; Leung, E.; et al. BIRC5/Survivin is a novel ATG12–ATG5 conjugate interactor and an autophagy-induced DNA damage suppressor in human cancer and mouse embryonic fibroblast cells. *Autophagy* **2020**, *16*, 1296–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Massagué, J.; Obenauf, A.C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **2016**, *529*, 298–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Chen, J.; Wang, M.; Xiang, Y.; Ru, X.; Ren, Y.; Liu, X.; Qiu, L.; Zhang, Y. Nrf1 Is Endowed with a Dominant Tumor-Repressing Effect onto the Wnt/ β -Catenin-Dependent and Wnt/ β -Catenin-Independent Signaling Networks in the Human Liver Cancer. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 5138539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 178–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Li, C.-J.; Chu, P.-Y.; Yiang, G.-T.; Wu, M.-Y. The Molecular Mechanism of Epithelial–Mesenchymal Transition for Breast Carcinogenesis. *Biomolecules* **2019**, *9*, 476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Folkman, J.; Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931–10934. [[PubMed](#)]
109. Folkman, J.; Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science* **1987**, *235*, 442–447. [[CrossRef](#)]
110. Tonini, T.; Rossi, F.; Claudio, P.P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* **2003**, *22*, 6549–6556. [[CrossRef](#)]
111. Torisu, H.; Ono, M.; Kiryu, H.; Furue, M.; Ohmoto, Y.; Nakayama, J.; Nishioka, Y.; Sone, S.; Kuwano, M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int. J. Cancer* **2000**, *85*, 182–188. [[CrossRef](#)]
112. Coussens, L.M.; Raymond, W.W.; Bergers, G.; Laig-Webster, M.; Behrendtsen, O.; Werb, Z.; Caughey, G.H.; Hanahan, D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1382–1397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Coussens, L.M.; Tinkle, C.L.; Hanahan, D.; Werb, Z. MMP-9 Supplied by Bone Marrow–Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell* **2000**, *103*, 481–490. [[CrossRef](#)]
114. Greten, F.R.; Eckmann, L.; Greten, T.F.; Park, J.M.; Li, Z.-W.; Egan, L.J.; Kagnoff, M.F.; Karin, M. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **2004**, *118*, 285–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Hudson, J.D.; Shoaibi, M.A.; Maestro, R.; Carnero, A.; Hannon, G.J.; Beach, D.H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1375–1382. [[CrossRef](#)]
116. Martins-Green, M.; Boudreau, N.; Bissell, M.J. Inflammation is responsible for the development of wound-induced tumors in chickens infected with Rous sarcoma virus. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4334–4341.
117. Müller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M.E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S.N.; et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **2001**, *410*, 50–56. [[CrossRef](#)]
118. Giavazzi, R.; Garofalo, A.; Bani, M.R.; Abbate, M.; Ghezzi, P.; Boraschi, D.; Mantovani, A.; Dejana, E. Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4771–4775.
119. Singh, N.; Baby, D.; Rajguru, J.P.; Patil, P.B.; Thakkannavar, S.S.; Pujari, V.B. Inflammation and cancer. *Ann. Afr. Med.* **2019**, *18*, 121–126. [[CrossRef](#)]
120. Arulselvan, P.; Fard, M.T.; Tan, W.S.; Gothai, S.; Fakurazi, S.; Norhaizan, M.E.; Kumar, S.S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 5276130. [[CrossRef](#)]
121. Vijay, K.; Sowmya, P.R.-R.; Arathi, B.P.; Shilpa, S.; Shwetha, H.J.; Raju, M.; Baskaran, V.; Lakshminarayana, R. Low-dose doxorubicin with carotenoids selectively alters redox status and upregulates oxidative stress-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2018**, *118*, 675–690. [[CrossRef](#)]
122. Shin, J.; Song, M.-H.; Oh, J.-W.; Keum, Y.-S.; Saini, R.K. Pro-oxidant Actions of Carotenoids in Triggering Apoptosis of Cancer Cells: A Review of Emerging Evidence. *Antioxidants* **2020**, *9*, 532. [[CrossRef](#)]
123. Lin, H.-W.; Chen, Y.-C.; Liu, C.-W.; Yang, D.-J.; Chen, S.-Y.; Chang, T.-J.; Chang, Y.-Y. Regulation of virus-induced inflammatory response by Dunaliella salina alga extract in macrophages. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *71*, 159–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

124. Rosa, G.P.; Tavares, W.R.; Sousa, P.M.C.; Pagès, A.K.; Seca, A.M.L.; Pinto, D.C.G.A. Seaweed Secondary Metabolites with Beneficial Health Effects: An Overview of Successes in In Vivo Studies and Clinical Trials. *Mar. Drugs* **2019**, *18*, 8. [CrossRef] [PubMed]
125. Asai, A.; Yonekura, L.; Nagao, A. Low bioavailability of dietary epoxyxanthophylls in humans. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 273–277. [CrossRef] [PubMed]
126. Abidov, M.; Ramazanov, Z.; Seifulla, R.; Grachev, S. The effects of Xanthigen™ in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes Obes. Metab.* **2010**, *12*, 72–81. [CrossRef] [PubMed]
127. Hashimoto, T.; Ozaki, Y.; Mizuno, M.; Yoshida, M.; Nishitani, Y.; Azuma, T.; Komoto, A.; Maoka, T.; Tanino, Y.; Kanazawa, K. Pharmacokinetics of fucoxanthinol in human plasma after the oral administration of kombu extract. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1566–1569. [CrossRef] [PubMed]
128. Mikami, N.; Hosokawa, M.; Miyashita, K.; Sohma, H.; Ito, Y.M.; Kokai, Y. Reduction of HbA1c levels by fucoxanthin-enriched akamoku oil possibly involves the thrifty allele of uncoupling protein 1 (*UCP1*): A randomised controlled trial in normal-weight and obese Japanese adults. *J. Nutr. Sci.* **2017**, *6*, e5. [CrossRef]
129. Ren, R.; Azuma, Y.; Ojima, T.; Hashimoto, T.; Mizuno, M.; Nishitani, Y.; Yoshida, M.; Azuma, T.; Kanazawa, K. Modulation of platelet aggregation-related eicosanoid production by dietary F-fucoidan from brown alga *Laminaria japonica* in human subjects. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 880–890. [CrossRef]
130. Hitoe, S.; Shimoda, H. Seaweed Fucoxanthin Supplementation Improves Obesity Parameters in Mild Obese Japanese Subjects. *Funct. Foods Health Dis.* **2017**, *7*, 246. [CrossRef]
131. ClinicalTrials.gov is a Database of Privately and Publicly Funded Clinical Studies Conducted Around the World. It is a resource provided by the United States National Library of Medicine. Available online: <https://clinicaltrials.gov/> (accessed on 21 July 2020) (updated on 23 October 2020).
132. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70. [CrossRef]
133. Ferreira, S.; Dutreix, M. DNA repair inhibitors to enhance radiotherapy: Progresses and limitations. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* **2019**, *23*, 883–890. [CrossRef] [PubMed]
134. Rocha, C.R.R.; Silva, M.M.; Quinet, A.; Cabral-Neto, J.B.; Menck, C.F.M. DNA repair pathways and cisplatin resistance: An intimate relationship. *Clin. Sao Paulo Braz.* **2018**, *73*, e478s. [CrossRef] [PubMed]
135. Liberti, M.V.; Locasale, J.W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 211–218. [CrossRef]
136. Rosen, R.; Vagaggini, T.; Chen, Y.; Hu, D.-N. Zeaxanthin inhibits hypoxia-induced VEGF secretion by RPE cells through decreased protein levels of hypoxia-inducible factors-1 α . *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 687386. [CrossRef] [PubMed]
137. Zhao, D.; Kwon, S.-H.; Chun, Y.S.; Gu, M.-Y.; Yang, H.O. Anti-Neuroinflammatory Effects of Fucoxanthin via Inhibition of Akt/NF- κ B and MAPKs/AP-1 Pathways and Activation of PKA/CREB Pathway in Lipopolysaccharide-Activated BV-2 Microglial Cells. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 667–677. [CrossRef]
138. Coussens, L.M.; Zitvogel, L.; Palucka, A.K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: A magic bullet? *Science* **2013**, *339*, 286–291. [CrossRef]
139. Ye, G.-L.; Du, D.-L.; Jin, L.-J.; Wang, L.-L. Sensitization of TRAIL-resistant cervical cancer cells through combination of TRAIL and fucoxanthin treatments. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2017**, *21*, 5594–5601. [CrossRef]
140. Eid, S.Y.; El-Readi, M.Z.; Wink, M. Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 977–987. [CrossRef]

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



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article n°2: β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin promotes modification of undifferentiated cells population and disrupts the inflammatory status in primary cultures of neural stem cells (2022)

Toxicology 482 (2022) 153358



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol



β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin promotes modification of undifferentiated cells population and disrupts the inflammatory status in primary cultures of neural stem cells

Sarah Méresse^{a, *}, Vanessa Larrigaldie^a, Asma Oummadi^{a, b}, Vidian de Concini^a, Séverine Morisset-Lopez^c, Flora Reverchon^a, Arnaud Menuet^a, Céline Montécot-Dubourg^a, Stéphane Mortaud^a

^a CNRS and University of Orleans, UMR7355, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, 45071 Orleans, France

^b Macquarie University Centre for MND Research, Department of Biological Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, Macquarie University, Sydney, NSW, Australia

^c CNRS and University of Orleans, UPR4301, Center for Molecular Biophysics, 45071 Orleans, France

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Thomas Knudsen

Keywords:

BMAA
Cyanotoxin
Neural stem cells
Neurotoxicity
Neuroinflammation
One health

ABSTRACT

β -N-Methyl-Amino-L-Alanine (BMAA) produced by 95% of cyanobacteria is in constant augmentation with cyanobacteria worldwide proliferation due to global warming and eutrophication. Previously, it has been shown that this contaminant induced neurological disorders, notably by acting as a developmental toxin. However, very few studies focus on the impact of BMAA on neuroglial cells, like astrocytes and microglial cells, in a developmental context. In the present study, we investigated whether BMAA disturbs neurogenesis from mice sub-ventricular zone (SVZ) cells and whether this neurotoxin induces neuroinflammation. We show that BMAA at 100 μ M disturbs the population of undifferentiated cells (B1 and C cells) and promotes their proliferation. Further, BMAA affects the organization of neuroblasts, indicating that SVZ function could be impaired. BMAA affects neuroinflammatory processes by increasing the release of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α . Our study adds to evidence that BMAA may disturb the central nervous system homeostasis by targeting glial cells. We highlighted that BMAA may impair SVZ niches and drives astrocytes and microglial cells into a proinflammatory status, with an amoeboid shape for microglia.

1. Introduction

The involvement of environmental pollutants in the development of nervous system pathologies has been proposed for several years. The β -N-Methyl-Amino-L-Alanine cyanotoxin (BMAA) is a non-proteinaceous amino-acid produced by two distinct groups of microalgae, diatoms and dinoflagellates (Jiang et al., 2014; Lage et al., 2014), and also by more than 95% of all cyanobacterial species (Cox et al., 2005). It is suspected of causing neurodegenerative disorders. Indeed, this toxin is increasingly considered a potential environmental risk factors for sporadic neurodegenerative diseases outcome, such as Alzheimer's Disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis and amyotrophic

lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (Caller et al., 2018; Cox et al., 2016, 2018; Pablo et al., 2009).

Cyanobacteria are present worldwide especially in aquatic environments. Global warming and eutrophication both contribute to increasing algae blooms and consequently the presence of BMAA (Paerl and Huisman, 2008). Thus, BMAA represents a global public health issue due to the chronic exposition of humans and other species. Recreational waters and seafood are the main sources of contamination (Réveillon et al., 2015). Indeed, this toxin has been detected especially in filter-feeding bivalves and fish (Masseret et al., 2013; Réveillon et al., 2014; Jiang et al., 2014; Lance et al., 2018). BMAA can bioaccumulate among the trophic chain (Cox et al., 2003) leading to high amounts in

* Correspondence to: CNRS and University of Orleans, UMR7355, Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orleans, France.

E-mail addresses: sarah.meresse@cnrs-orleans.fr (S. Méresse), vanessa.larrigaldie@cnrs-orleans.fr (V. Larrigaldie), asma.oummadi@cnrs-orleans.fr (A. Oummadi), vidian.deconcini@cnrs-orleans.fr (V. de Concini), severine.morisset-lopez@cnrs-orleans.fr (S. Morisset-Lopez), flora.reverchon@cnrs-orleans.fr (F. Reverchon), arnaud.menuet@cnrs-orleans.fr (A. Menuet), celine.dubourg@cnrs-orleans.fr (C. Montécot-Dubourg), smortaud@cnrs-orleans.fr (S. Mortaud).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153358>

Received 9 August 2022; Received in revised form 6 October 2022; Accepted 24 October 2022

Available online 27 October 2022

0300-483X/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

apex predators. Recently, studies of the marine environment have shown high levels of BMAA in sharks and dolphins, with neurodegenerative alterations in the latter (Mondo et al., 2012; Hammerschlag et al., 2016). Disturbingly, BMAA was also measured in the human central nervous system (CNS) (Pablo et al., 2009; Bertzon et al., 2015). Current evidence suggests that neurodegenerative diseases have multifactorial and complex origins but also that they have their roots early in the developmental period (Tartaglione et al., 2015). Indeed, the neurodevelopmental process is a critical and particularly sensitive period to exposure to toxicants. A disturbance during this period may therefore alter the development of neural structures and/or lead to short- and long-term adverse consequences (Rice and Barone, 2000; Padmanabhan et al., 2016). The core principle is the basis for the Barker hypothesis known as the Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) approach (Sinclair and Singh, 2007).

Therefore, neural stem cells (NSCs) appear clearly as a useful *in vitro* model to study the mechanisms of developmental neurotoxicology (Tofighi et al., 2011). Indeed, NSCs have the potential to differentiate into neurons, oligodendrocytes, astrocytes and to self-renew sufficiently to generate the CNS from a reduced number of NSCs (McKay, 1997; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Two regions of the mature mammalian brain generate new neurons: the subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus and the subventricular zone (SVZ). The process of neurogenesis starts with B1 cells (Bonaguidi et al., 2011; Merkle et al., 2004) form transient amplifying type C cells by asymmetric cell division. Type C cells in turn form neuronal progenitor cells (neuroblasts, type A cells) astrocytes. Recently, Pierozan et al. (2020) showed that hippocampal neural stem cells are more susceptible to BMAA than primary neurons. They demonstrated that BMAA induced apoptosis in NSCs at a dose twelve times lower than that required to decrease viability in primary neuron cultures. In addition, low BMAA concentration inhibited neural stem cells differentiation into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. However, while some studies highlighted the potential neurotoxic effects of BMAA on these neurodevelopmental cells (Scott and Downing, 2017; Pierozan and Karlsson, 2019) the effect of BMAA on the neuroinflammatory function, especially mediated by astrocytes and microglia remained to be characterized (Stephenson et al., 2018).

In this context microglial cells, considered the resident macrophage of the CNS are particularly important to consider. Indeed, it has been demonstrated that microglia has crucial and distinct roles during development, including regulating cell differentiation and neurogenesis. Microglia phagocytose several cell products from dead, dying, and living cells (Lenz and Nelson, 2018; Cunningham et al., 2013) and secrete a set of cytokines such as IL-1 β and TNF α modulating the neurodevelopmental events (Butovsky et al., 2006; Shigemoto-Mogami et al., 2014).

Therefore, in the current study, we investigated the impact of chronic exposure to low BMAA concentration according to the literature during cellular differentiation of NSCs primary culture from SVZ containing microglia. After assessing BMAA-induced cytotoxicity and viability, we characterized the cell population after one week of differentiation. Further, in order to elucidate whether BMAA induces neuroinflammation, we investigated the activation status of the immunocompetent cells, astrocytes and microglial cells, the morphological changes of microglial cells and the release of proinflammatory cytokines induced by BMAA.

2. Material and methods

2.1. Animals and animal care

C57BL/6Jrj breeding mice (Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a temperature and humidity-controlled environment on a 12 h light/dark cycle with ad libitum access to water and food. Animal care and experimentation were in accordance with the European

Communities Council directive (2010/63/EU) and the French Minister under APAFIS#21860.

2.2. Cell culture and BMAA exposure

In vitro murine primary NSCs cultures from SVZ neurogenic niches were performed on postnatal days 1–5 mice and NSCs were cultured as previously described (Delgehyr et al., 2015; Feat-Vetel et al., 2018). NSCs culture was made from at least four pups. Briefly, to obtain a single-cell suspension the olfactory bulbs and hippocampus were removed from neonatal brains and the meninges were peeled off. The dissected telencephalons was mechanically dissociated before enzymatic digestion with papain (Sigma, P4792). The cells were then resuspended in DMEM medium (Sigma, D5671), completed with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GE Healthcare HyClone), 1000 units/mL Penicillin-Streptomycin (GIBCO 15070–063) and 2 mM of L-Glutamine (GIBCO, 25030–024). The cells were plated on poly-L-lysine (5 μ g/mL, BD Biosciences) precoated 25 cm² flasks. Two flasks were used for one brain. NSCs are maintained in cultures at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator until confluence. To avoid toxicity of cellular debris, medium was replaced the following day, and then every second day, with the medium containing Epidermal Growth Factor (EGF, 30 ng/mL Sigma E9644) to keep cells in an undifferentiated status. When the cells reach confluence, usually 7 days after plating, they were detached with trypsin (Sigma, 59417 C) and plated at 1.5×10^5 cells/well, in the presence of EGF. Five days after passaging, the medium culture was replaced by DMEM/F12 (Gibco, 11320033) completed with N-2 supplement (Fisher Scientific, 11520536) to promote differentiation into neuroglial cells. Cells were treated every second day for one week with concentrations of 100 μ M to 3 mM BMAA (CAS number 16012–55–8, \geq 97%, Sigma, B107) during differentiation as indicated (Fig. 1).

2.3. Cytotoxicity and cell viability

2.3.1. LDH assay

Lactate dehydrogenase (LDH) is a soluble and stable cytosolic enzyme present in many cell types that is rapidly released into the cell culture medium upon disruption of the plasma membrane. LDH release was measured using the LDH-Glo™ Cytotoxicity assay (Promega, J2380) following the manufacturer's protocol. Briefly, 5 μ l of supernatant medium was collected from each sample after 48 h, 96 h and one week of treatment and stored at –20 °C into the storage buffer. LDH levels are measured by adding an equal volume of LDH Detection Reagent to the

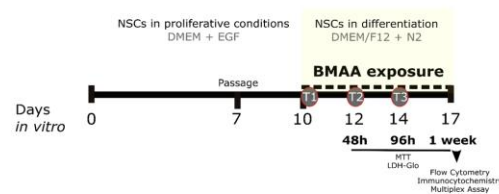


Fig. 1. Experimental protocol for the evaluation of the effects of BMAA in NSCs. *In vitro* murine primary NSCs were isolated from SVZ at day 0. After 7 days under proliferative conditions, cells were passaged and maintained in the same medium. The cells were then treated every second day with BMAA at the same time as medium change, at different concentrations (100 μ M, 300 μ M and 3 mM) while the differentiation occurs. 48 h, 96 h and one week after the first treatment the viability and the cytotoxicity were assessed by MTT and LDH-Glo assay. After one week of treatment, corresponding to a total of three treatments, cells populations and activation status were define by flow cytometry. At the same time-point the proliferation of undifferentiated cells, the population of neuroblast, and the morphology of microglial cells were assessed by immunocytochemistry. The release of proinflammatory cytokines was measured by Multiplex assay.

diluted sample. The luminescence was recorded after 40 min using a microplate reader (ClarioStar, BMG LABTECH).

2.3.2. MTT assay

Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-yl)2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma, M2003) assay. This test is based on the conversion of the tetrazolium salt to the colored product formazan by succinate dehydrogenase, which is a mitochondrial enzyme. Viability was measured after 48 h, 96 h and one week of treatment, in the primary culture of neural stem cells in differentiation. Briefly, NSC were plated at 4×10^4 cells per well in 96-well plates. At the end of exposure, MTT was added to the medium (5 mg/mL) and incubated for three hours. The formazan product generated was solubilized in dimethyl sulfoxide for 15 min and measured at 570 nm using a microplate reader (ClarioStar, BMG LABTECH).

2.4. Immunocytochemistry

To study cellular proliferation and differentiation, immunocytochemistry staining method was performed. Briefly, NSCs were plated at 1×10^5 cells per well in 24-well plates containing Poly-L-Lysine (Sigma, P1524) precoated glass coverslips. After one week of exposure, the medium was removed and the coverslips were washed with Tris-Buffer Saline 1X (TBS, pH 7.6, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM), fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min at room temperature. PFA was then washed with TBS. Cells were then permeabilized with TBS containing 10% FBS; 0,2% Triton X-100 (Euromedex, ref 2000-A) and 2% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, A9418) for 30 min at room temperature. Coverslips were then incubated at least three hours at room temperature using the following antibodies: anti-Ki67 (1:200, polyclonal IgG rabbit, Abcam ab15580); anti-Nestin (1:500, monoclonal IgG1k mouse, Abcam ab11306); anti-Doublecortin (1:500, polyclonal IgG rabbit, Abcam ab77450) for neuroblasts (A cells); anti-Iba1 (1:250, polyclonal IgG goat). Coverslips were rinsed with TBS and incubated with appropriate secondary antibodies (1:500, anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat Alexa 488 or TRITC-conjugated) for 45 min, also at room temperature in TBS solution with 10% FBS solution and 2% BSA. Then, coverslips were rinsed and incubated two minutes with DAPI, to visualize the cell nuclei. Coverslips were rinsed three times in TBS and once in distilled water before being mounted on glass slides in mounting-medium Fluoromount-G (Clinisciences K024-200). Microscopic images were obtained using a fluorescent microscope Leica DM6000B with Metamorph software with 20x or immersed 100x magnification. For each condition, at least three replicates were studied. For each replicate, at least three fields were scored per coverslip and then averaged. Distances and dimensions were measured using the Image J® software (NIH Image, Schneider et al., 2012).

2.5. Flow cytometry

Cellular populations, differentiation and neuroinflammatory status were assessed by flow cytometry. NSCs were plated at 1×10^5 cells per well in 6-well plates. After one week of exposure, cells were stained with fluorescent label antibodies: Fixable Viability Dye (eBiosciences™, 65-0865-14, 1/800), anti-ACSA2 APC (MILTENYI, 130-117-386, 1:50), anti-CD45 V450 (BD Horizon™, 560501, 1:100), anti-CD11b PerCP/Cy5 (BD Pharmingen™, 560993, 1:100), anti-CD86 FITC (BD Biosciences, 561961, 1:100), anti-CD206 PE-Cy7 (BioLegend, 141720, 1:100). Non-conjugated anti-CD16/32 antibody (BD Pharmingen™, 553142, 1:100) was used to block non-specific Fc receptors for 20 min at 4 °C. Then, the cells were washed and before fixation, neural stem cells population were stained with intracellular Nestin PE (MILTENYI, 130-119-799, 1:50), after cell permeabilization for 20 min at 4 °C with Cytofix/Cytoperm Plus Kit (BD Biosciences, Paris, France). Cells were then washed and resuspended in lysing solution (BD FACS™ Lysing Solution) before the acquisition. Data were acquired with a flow

cytometer (BD FACSCanto II) and analyzed with FlowJo v10 software (Tree Star, Ashland, OR). Very low SSC and very low FSC were excluded to strictly define the populations of interest. For the analysis, single live cells were pre-gated. Activation status was defined using the ratio CD86/CD206 obtained after staining with anti-CD86 antibody for proinflammatory status and anti-CD206 antibody for anti-inflammatory status.

2.6. MULTIPLEX assay

Supernatant samples were collected after one-week of exposure and differentiation of NSCs culture. A positive control was made with LPS at 100 ng/mL during four hours of treatment. Samples were stored at -80 °C until analyzed. All measurements were obtained from custom ProcartaPlex™ panels created by combining multiple simplex bead sets. IL-1 β , IL-6 and TNF α concentrations were determined according to the manufacturer's instructions using multiplex assay (Thermo Fisher, PXP-06).

2.7. Statistics

The results are presented as mean \pm SEM for each experimental group. Each point corresponds to a biological replicate. Since our data did not follow a normal distribution, differences compared with the control were analyzed by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests according to the number of groups, as non-parametric data. Using GraphPad Prism 9® (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). *P* values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Limited effects of BMAA exposure on cell toxicity and cell viability

We first aimed to determine if BMAA induces cytotoxicity or disturbs viability at 100 M, 300 μ M and 3 mM concentrations in neural stem cells. This was evaluated after 48 h, 96 h and one week of treatment during differentiation into neuroglial cells according to our experimental design (Fig. 1). The highest, 3 mM BMAA concentrations induced cytotoxicity after 48 h of treatment at 3 mM as compared to lower concentrations. This effect was transient or reversed 96 h or one week of treatment. After one week of treatment there seemed to be less LDH release in the medium, and therefore cytotoxicity (not significant) (Fig. 2A). Whatever the exposure time, BMAA exposure did not affect the viability (Fig. 2B). The highest concentration of BMAA studied was devoid of cell toxicity was 300 μ M. The concentration of 100 μ M was chosen to further analyze the effects of BMAA on cell differentiation, cell populations, and neuroinflammatory processes. This concentration is considered low in the literature.

3.2. BMAA exposure favors neural stem cells proliferation ability and impairs differentiation of undifferentiated cells

The effect of BMAA on proliferation of undifferentiated cells was studied by immunocytochemistry using Ki67 as a marker of proliferation and the maintenance of proliferation ability. To discriminate neural stem cells a Nestin staining was performed. Particular attention was paid to double-labeled cells. Representative images of the experiment are shown (Fig. 3A). The growth based on the total cell number was not affected by 100 μ M of BMAA at the end of the differentiation phases. Moreover, there was no modification of the proportion of cells in proliferation in cell culture. Thus, BMAA affected neither cell growth nor proliferation under these conditions (Fig. 3B). Interestingly, the proportion of Nestin⁺ undifferentiated neural cells in ability to proliferate was significantly higher after BMAA treatment. This suggested an imbalance in the population of undifferentiated cells which are B1 cells and C cells (Fig. 4A). Our in vitro cell culture model represents the

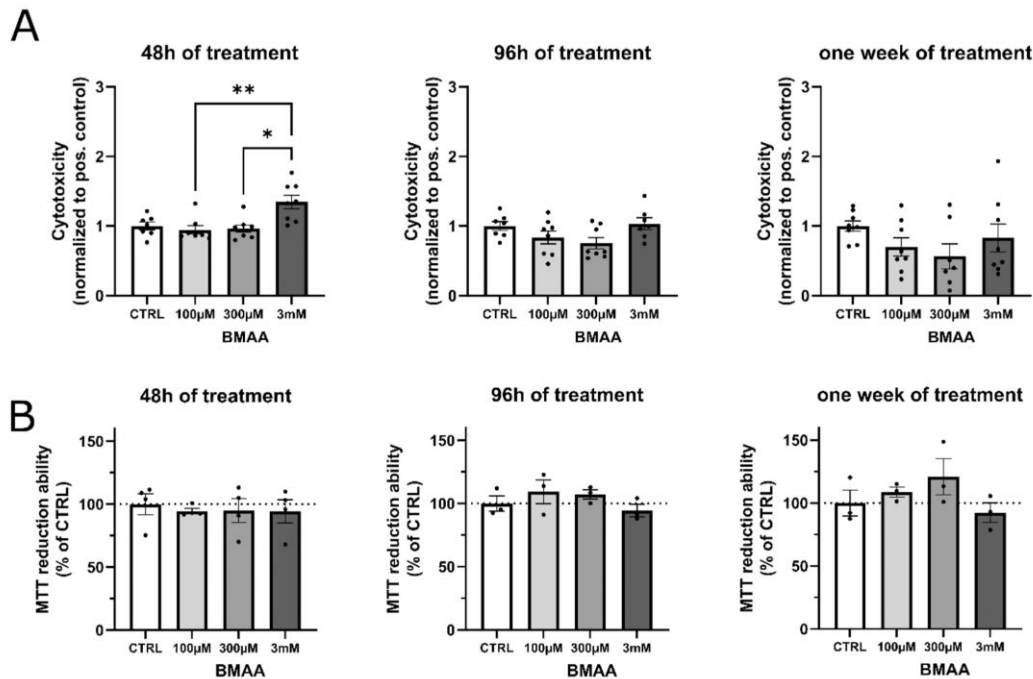


Fig. 2. Effects of BMAA on cell toxicity and viability in neural stem cells (NSCs) culture. Cell toxicity was determined using the LDH-Glo assay after treatment with 100 µM to 3 mM BMAA for 48 h, 96 h and one week during differentiation; 10% Triton X-100 was used as positive control. For 48 h of treatment CTRL n = 7; BMAA 100 µM n = 7; 300 µM n = 7; 3 mM n = 8. 96 h of treatment CTRL n = 7; BMAA 100 µM n = 8; 300 µM n = 8; 3 mM n = 7. One week of treatment CTRL n = 8; BMAA 100 µM n = 8; 300 µM n = 7; 3 mM n = 7 (A). Cell viability was determined using the MTT assay after treatment with 100 µM to 3 mM BMAA for 48 h, 96 h and one week during differentiation. For 48 h of treatment CTRL n = 4; BMAA 100 µM n = 3; 300 µM n = 4; 3 mM n = 4. 96 h of treatment CTRL n = 3; BMAA 100 µM n = 3; 300 µM n = 3; 3 mM n = 3. One week of treatment CTRL n = 3; BMAA 100 µM n = 3; 300 µM n = 3; 3 mM n = 3 (B). Values are normalized and represent mean ± SEM. Statistical differences are indicated: *p < 0.05, **p < 0.01 using Kruskal-Wallis test.

different stages of formation of several cell types characteristic of the SVZ (Feat-Vetel et al., 2018). Thus, we characterized the population of undifferentiated cells in detail by flow cytometry. A scheme of the specific staining used to discriminate each cellular population is shown (Fig. 4A) and representative dot blots are shown (Fig. 4B). Here, B1 cells were double-stained by Nestin and ACSA2 (astrocyte cell surface antigen-2). This antibody has been developed for the detection of astrocytes and also stain B1 cells (Kantzer et al., 2017). C cells were stained only by Nestin and astrocytes were only stained by ACSA2. Exposure to BMAA led to a small but significant decrease of B1 cell population, correlating with a trend increase of C cell populations (Fig. 4C). We did not observe changes in astrocyte populations.

3.3. BMAA disturbs the organization of neuroblasts

One of the characteristics of this cell culture model is also its ability to generate neuroblasts, like what occurs in SVZ. Similar to the in vivo situation, these migrating cells come together in chains and clusters. We demonstrated previously that environmental pollutants could affect the SVZ neuroblast population (Feat-Vetel et al., 2018). Thus, we next evaluated the effect of BMAA on the neuroblast population and organization by immunocytochemistry. To study the organization of neuroblasts we considered that two contiguous cells constituted a group and a scattered neuroblast is a neuroblast that was not in a cluster. Specific staining of neuroblasts by doublecortin (DCX) antibody is shown

(Fig. 5A). Cell growth based on the total cell number was not affected by 100 µM of BMAA at the end of the differentiation phase and neither was the number of neuroblasts (Fig. 5B). While the number of clustered and scattered neuroblasts were not affected, and the number of DCX⁺ cell clusters significantly increased after differentiation in presence of BMAA indicating that the organization of neuroblasts was affected (Fig. 5C).

3.4. Effects of BMAA exposure on the inflammatory status of B1 cells and astrocytes

NSCs may contribute to moderating neuroinflammation, mainly induced by immunocompetent cells such as astrocytes and microglia. Thus, we next assessed the effect of BMAA on the inflammatory status of B1 cells and astrocytes by flow cytometry. ACSA2 staining was used to label both B1 and astrocyte cell types; we were not able to distinguish those cell types. CD86 as a costimulatory marker of proinflammatory status and mannose receptor CD206 as marker of anti-inflammatory cells. Representative images are shown (Fig. 6B). BMAA didn't affect the population of B1 cells and astrocytes (Fig. 6C). Interestingly, ACSA2⁺ cells showed higher expression of CD86, the surface phenotype marker of proinflammatory status and less expression of CD206 the marker of anti-inflammatory status. To illustrate the balance between proinflammatory and anti-inflammatory status, we represented the ratio of CD86/CD206. It was significantly increased after one week of treatment with BMAA at 100 µM suggesting that ACSA2⁺ cells were under a

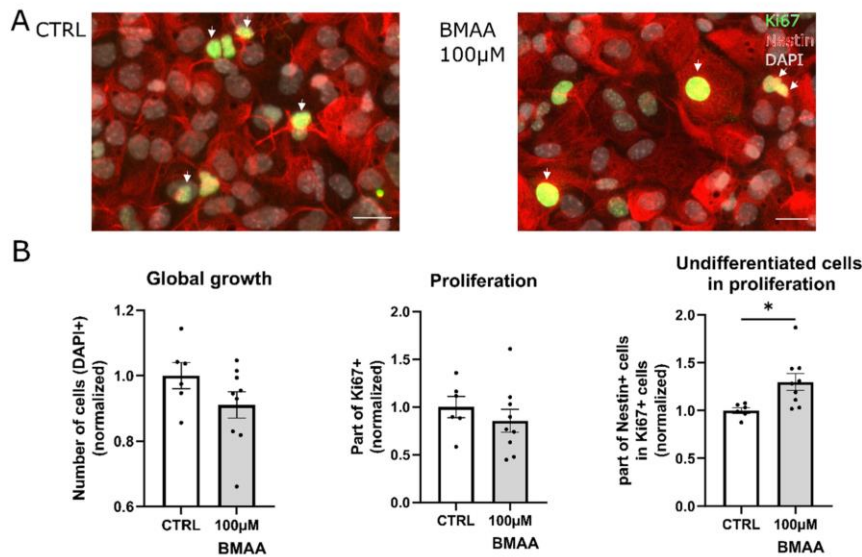


Fig. 3. Proliferation of undifferentiated cells after exposition to BMAA in neural stem cells (NSCs) culture. Cells proliferation was determined by immunocytochemistry with Nestin staining to discriminate undifferentiated cells and Ki67 for proliferative cells; Scale bar = 20 µm (A). Quantification of the total number of cells per field, proportion of proliferative cells and the proportion of Nestin positive cells in the proliferative cells populations after BMAA (100 µM) treatment as compared to untreated controls (B). Values represent mean ± SEM, normalized (CTRL n = 6; BMAA 100 µM n = 9). Statistical differences from control are indicated: * p < 0.05 using Mann-Whitney test.

proinflammatory status (Fig. 6C).

3.5. Effects of BMAA exposure on inflammatory status of microglial cells

Our in vitro primary culture model also has the advantage of containing a population of microglial cells. These cells are particularly important for neuroinflammation but also for SVZ homeostasis (Colonna and Butovsky, 2017). Indeed microglial cells have a key role in neural stem cell differentiation (Butovsky et al., 2006; Shigemoto-Mogami et al., 2014). Considering this, we next assessed the effect of BMAA on the inflammatory status of microglial cells by flow cytometry. CD11b and CD45 staining was used to define microglial cells and CD86 and CD206 were used to determine their activation status. Representative images are shown (Fig. 6D). BMAA treatment did not affect the frequency of microglial cells in SVZ NSCs culture (Fig. 6E). Microglial cells also showed higher expression of CD86 and less expression of CD206; the ratio of CD86/CD206 was drastically increased after one week of treatment with BMAA at 100 µM, suggesting that microglial cells were also under a proinflammatory status (Fig. 6E).

3.6. BMAA turns microglial cells into amoeboid shape

Based on the suggested proinflammatory status of BMAA-exposed microglial cells, the morphology of these cells were studied by immunocytochemistry. Representative images of Iba1⁺ microglial cells are shown (Fig. 7A). Indeed, Zanier et al. (2015) showed that the activated microglia could be characterized by their shape especially in terms of solidity and circularity. Here we show that BMAA exposure caused morphological modifications of microglial cells. Indeed, the results revealed a decrease of more than 20% of the area and the perimeter compared to control, indicating that microglia cells were smaller in BMAA conditions, as compared to controls (Fig. 7B). The significant increase in both solidity and circularity parameters indicated a larger

proportion of microglia in amoeboid shape after BMAA exposure as compared to controls. Thus, BMAA exposed microglia exhibit morphological characteristics of proinflammatory activated status.

3.7. BMAA exposure triggers the release of proinflammatory cytokines

Our cell culture model derived from SVZ NSCs allows us to study the interactions between cell populations, such as astrocytes and microglia, which can lead to the release of neuroinflammation mediators. When microglia and astrocytes were in proinflammatory status we evaluated the effect of BMAA on proinflammatory cytokine release, such as IL-1β, IL-6 and TNFα, which are considered major mediators of neuroinflammation. Multiplex analysis showed that exposure to BMAA at 100 µM for one week, induced an increase of IL-1β, IL-6 and TNFα release in the supernatant (Fig. 8). For each cytokine, the increase was about twofold. Thus, BMAA exposure triggered a sustained release of proinflammatory cytokines in SVZ NSCs culture.

4. Discussion

The central nervous system development requires an intricately orchestrated balance between the proliferation of the multipotent neural stem cells, differentiation into the appropriate cell types, and the subsequent migration of these cells. During the development of the CNS, cell proliferation, migration and differentiation are highly sensitive to environmental exposure (Coullery et al., 2016). Slight perturbation of these neurodevelopmental processes may lead to impairments of the brain and could have long-term effects on adult neuropathologies (Homem et al., 2015). Here, we established an in vitro neurotoxicity assay based on neonate SVZ. Our culture model allows us to evaluate the impact of toxins such as BMAA on the early stages of neurogenesis. In addition, we can assess the role of early toxin exposure on neuropathologies involving an environmental component. Due to the presence of both

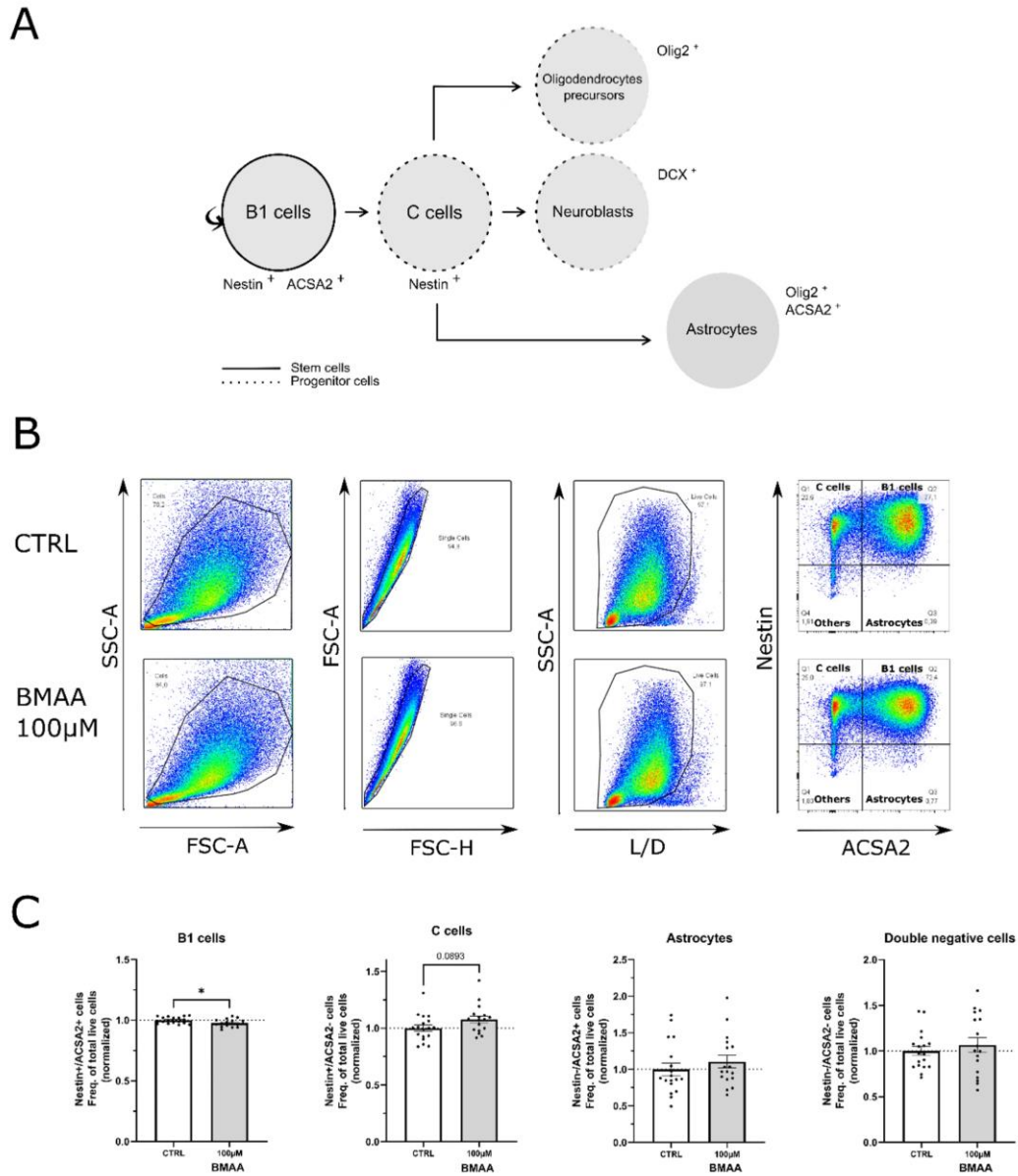


Fig. 4. Effects of BMAA on neural stem cells (NSCs) differentiation. Cells populations were determined by flow cytometry; Staining to determine cell populations of B1, C and Astrocytes cells (A). A gate was created on non-debris populations, excluding very low SSC/FSC events. Cells were gated on single cells and selected by Live/Dead staining. Then, populations were gated according to Nestin and ACSA2 staining (B). Quantification of B1 cells, C cells and Astrocytes and other cells which are negative to both staining after BMAA (100 µM) treatment as compared to untreated controls (C). Values represent mean ± SEM, normalized (CTRL n = 18; BMAA 100 µM n = 17). Statistical differences from control are indicated: * p < 0.05 using Mann-Whitney test.

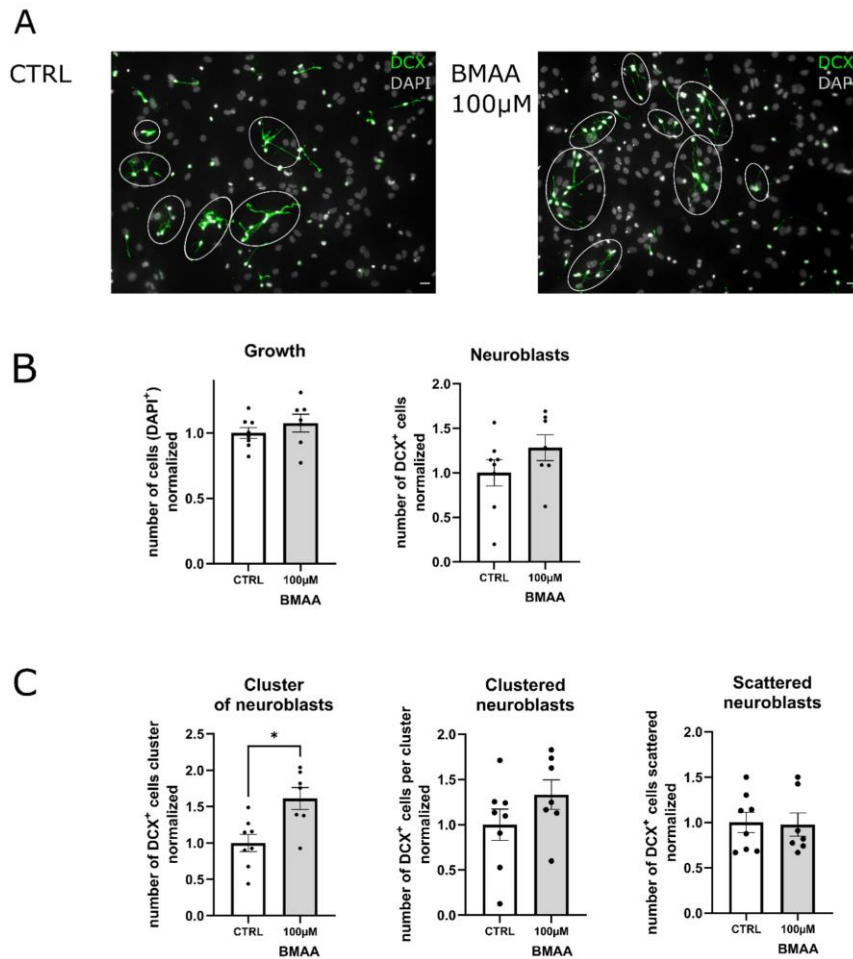


Fig. 5. Effects of 100 µM of BMAA on population and organization of neuroblasts from neural stem cells (NSCs). Neuroblasts were determined by immunocytochemistry using DCX staining; scale bar = 20 µm (A). Quantification of the total number of cells per field to illustrate the growth and the percentage of DCX positive cells (B). Quantification of the organization of neuroblasts; number of cluster, number of neuroblasts per cluster and number of scattered neuroblasts after BMAA (100 µM) treatment as compared to untreated controls (C). Values represent mean ± SEM (CTRL n = 8; BMAA 100 µM n = 7). Statistical differences are indicated: *p < 0.05 using Mann-Whitney test.

immunocompetent cells, astrocytes and microglial cells, we are also able to assess neuroinflammation.

We showed that BMAA toxin enhances the proliferative ability of undifferentiated cells originating from SVZ derived NSCs culture after one week exposure. This was accompanied by a decrease in B1 cells and an increase in C cell population. Many pollutants are already known to have adverse effects on glial differentiation from SVZ niches (Masood et al., 2021; Tiwari et al., 2015; Wang et al., 2017). In the nervous system, keeping a certain proportion of each population is a prerequisite for maintaining its normal structure and function. SVZ harbors the NSCs and represents the main site of primary and secondary neurogenesis (Inta et al., 2008; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). On the other neurogenic niche, exposure to 100 µM of BMAA inhibited the differentiation of NSCs into astrocytes, neurons and oligodendrocytes in the dentate

gyrus of hippocampus (Pierozan et al., 2020). Our study further adds evidence to previous research indicating that the effects of BMAA can differ depending on the brain area and therefore cells type (Pierozan and Karlsson, 2019). Indeed, Pierozan and Karlsson reported that exposure to BMAA reduced striatal neural stem cells proliferation (Pierozan and Karlsson, 2019) and they also showed an increase in the percentage of undifferentiated cells in the hippocampus (Pierozan et al., 2020). These data confirmed a regional specification of NSCs including distinct molecular control, cell division modes and susceptibility to toxicants (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). Considering that perturbations during neurogenesis could lead to long-term effects related to senility and neurodegenerative diseases (Babcock et al., 2021; de Pablo-Fernández et al., 2019; Horgusluoglu et al., 2017), BMAA could act as a neurodevelopmental toxin and promote the onset of neurological

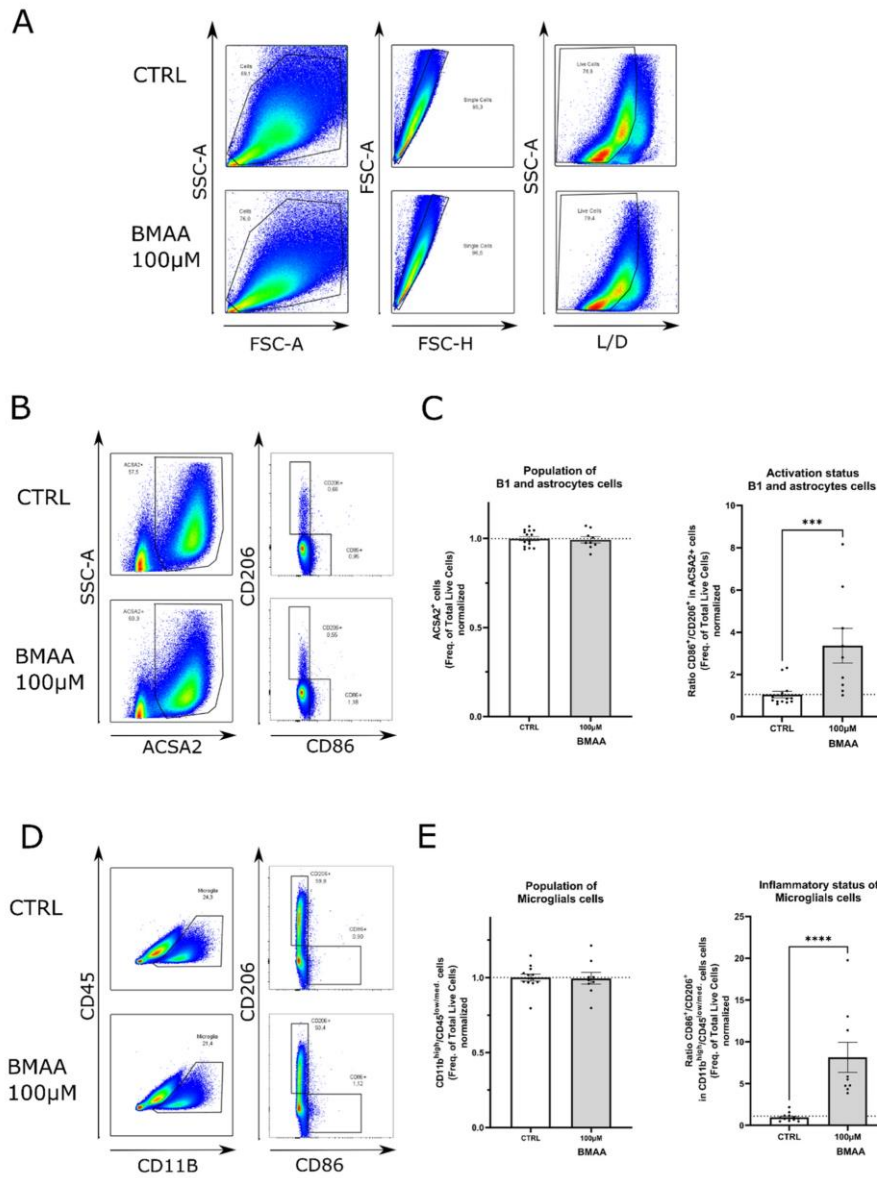


Fig. 6. Effects of BMAA on activation status of ACSA2 + and microglial cells in neural stem cells (NSCs) culture. Cell populations and activation status were determined by flow cytometry. A gate was first created on non-debris populations, excluding very low SSC/FSC events; cells are then gated on single cells and selected by Live/Dead staining (A). Astrocytes and B1 cells were gated as ACSA2 positive; activation status was determined through CD86 and CD206 staining (B). Quantitative analysis of the population of ACSA2 + cells and the ratio of CD86 + cells on CD206 + cells after BMAA (100 µM) treatment as compared to untreated controls (C). Microglial cells were gated as CD11b^{high} and CD45^{low/medium}; activation status was determined through CD86 and CD206 staining (D). Quantitative analysis of the population of microglial cells and the ratio of CD86 + cells on CD206 + cells after treatment BMAA (100 µM) treatment as compared to untreated controls (E). Values are normalized and represent mean ± SEM (CTRL n = 13; BMAA 100 µM n = 9). Statistical differences from control are indicated: *** p < 0.001; **** p < 0.0001 using Mann-Whitney test.

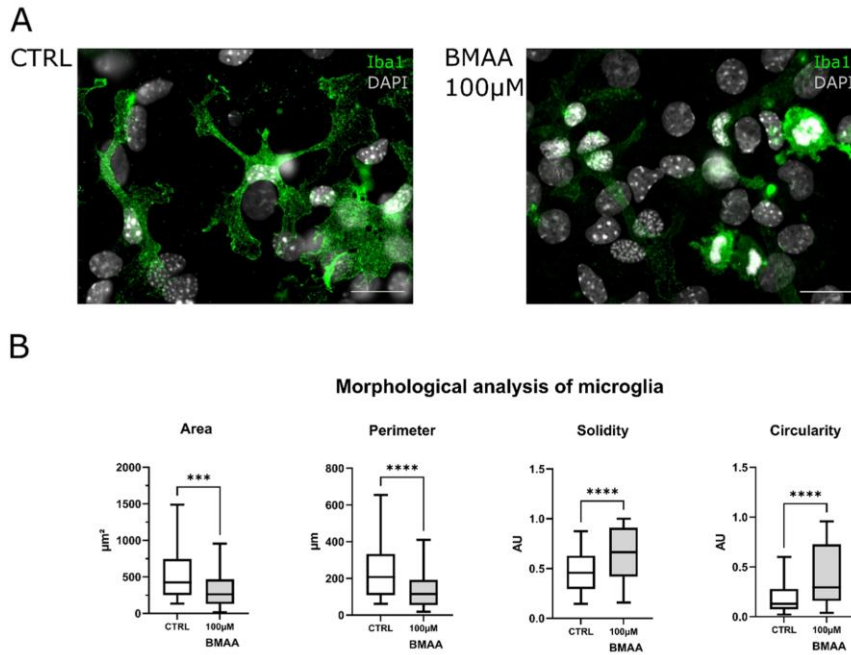


Fig. 7. Effects of BMAA on microglial cells morphology in neural stem cells (NSCs) culture. Cell morphology was determined by immunocytochemistry; Representative microscopic photograph of Iba1 staining to visualize microglia; Scale bar = 20 µm (A). Quantitative analysis of microglial cell morphology using Image-J software. Each boxplot summarizes the measurement of each microglial cells in one experimental conditions of each cell culture; area, perimeter, solidity and circularity were analyzed after BMAA (100 µM) treatment as compared to untreated controls (B). Values represent mean ± SEM (CTRL n = 44; BMAA 100 µM n = 102). Statistical differences from control are indicated: * ** p < 0.001; **** p < 0.0001 using Mann-Whitney test.

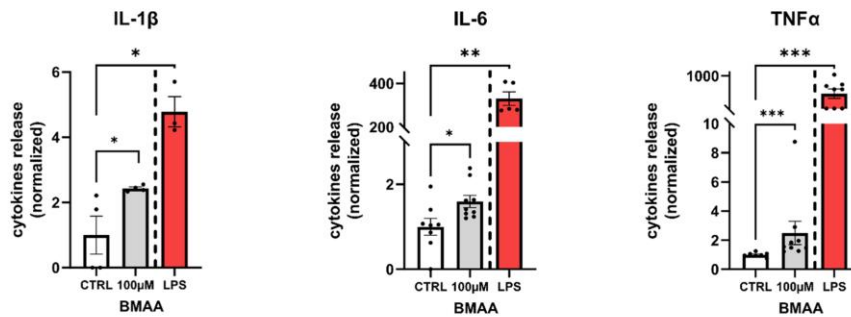


Fig. 8. Effects of BMAA on proinflammatory cytokines release in neural stem cells (NSCs) culture. Levels of cytokines IL-1β, IL-6, TNFα release in the supernatant after one week of culture in the absence or presence of BMAA (100 µM) were measured by multiplex. For positive control, cells were treated during four hours at 100 ng/mL with LPS. Values represent mean ± SEM. IL-1β: CTRL n = 4; BMAA 100 µM n = 4; LPS n = 3. IL-6: CTRL n = 7; BMAA 100 µM n = 9; LPS n = 5. TNFα CTRL n = 7; BMAA 100 µM n = 9; LPS n = 8. Statistical differences from control are indicated: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 using Mann-Whitney test.

disorders later in life.

In addition, BMAA also acts on the migration of neuroblasts in rodents. Neuroblasts, which are neuronal precursors, migrate toward the olfactory bulb to become mature local interneurons in mice. *In vivo* this migration occurs throughout the lateral wall of the lateral ventricle, where the precursors form specific networks are organized in chains until they reach the olfactory bulb (Alvarez-Buylla, 1997). Here, we highlight for the first time that BMAA modifies neuroblast organization

by increasing the number of clusters. Neuroblasts clustering has already been observed in response to injury (Masuda et al., 2007; Zamboni et al., 2020). These grouping may correspond *in vivo* to disorganization, which can lead to disturbance of migration as we have shown in the laboratory for a pesticide, a structural analog of glutamate (Herzine et al., 2016). The mechanisms leading to these alterations involve the amino acid analogue character of these compounds, which moreover has the analogue character of a neurotransmitter in both cases. The

neurotransmitter amino-acid glutamate is of crucial importance during the migration of neuronal precursor cells from the SVZ to the olfactory bulb (Platel et al., 2010). BMAA is defined as an amino acid analog and is an agonist of metabotropic glutamate receptors (mGluR) (Aronica et al., 1993). Considering this, we hypothesized that BMAA could affect neuroblast migration by misincorporating into proteins, as a substitute of amino acid (Korn et al., 2020). In addition, BMAA can interfere with glutamate signalling and thus with SVZ functions. Indeed, di Giorgi Gerevini et al. (2004); di Giorgi-Gerevini et al. (2005) highlighted mGlu receptors expression in NSCs. Such alteration of neuroblasts organization has been reported in pathologies such as Autism Spectrum Disorders (ASD) and AD (Scopa et al., 2020; Wegiel et al., 2010). Our results confirm that BMAA could lead to abnormal neurogenesis and act as a neurodevelopmental toxin. However further *in vivo* experiments are needed to link early exposition to BMAA with late neuropathologies.

On another side, neuroinflammation can disrupt neurodevelopment processes. It has been previously described that inflammation can disturb neuroblasts migration and organization (Ekdahl et al., 2009; Tepavčević et al., 2011; Fritze et al., 2020). During development, neuroinflammation leads to a greater incidence of neurodevelopmental disorders, such as ASD, schizophrenia and epilepsy (Pantelis et al., 2021). Here, we showed that 100 μ M of BMAA drives astrocytes and microglia toward proinflammatory status in SVZ derived NSCs. Mannose receptor/CD206 expression is a hallmark of anti-inflammatory immunocompetent cells while CD86 receptor characterizes proinflammatory activation status (Smith et al., 2016). Here we report a higher ratio of CD86/CD206 of those immunocompetent cells represented by astrocytes and microglia after BMAA exposure. We hypothesized that BMAA might also affect neuroblasts migration by inducing astrocytes and microglia in proinflammatory status.

During neuroinflammatory processes the physiological activity of microglia is modified (Borst et al., 2021). In a resting state, microglia are involved in surveying their microenvironment thanks to motile processes and ramifications (Nimmerjahn et al., 2005). However after injury, microglial cells are activated and exert neurotoxic or neuroprotective effects, depending on their phenotype (Butovsky et al., 2015; Le et al., 2016). Here, we also report morphological modifications such as ameboid (or spherical) morphology, characteristics of proinflammatory activation status (Kettenmann et al., 2011; Vogel et al., 2014). However it's interesting to notice that this shape is prominent during CNS development without inducing neuroinflammation (Alliot et al., 1999). *In vitro* and *in vivo* ameboids activated microglia closely interact with NSCs residing in distinct neurogenic niches. Activated microglia have differential effects on the NSCs proliferation, migration and differentiation (Vay et al., 2018). Nevertheless, the ameboid shape of microglial cells can be associated with the release of proinflammatory cytokines (Hurley et al., 1999). As a positive control, acute exposure to LPS showed the ability of our cell culture to release proinflammatory cytokines. Our data demonstrate an increased release of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α following chronic BMAA exposure suggesting that neuroinflammation will disturb cellular homeostasis. Among them, TNF α is known for enhancing the survival of neural stem cells and thereby modeling repair after inflammation (Bernardino et al., 2008). In fact, NSCs are known to proliferate in an inflammatory context to inhibit the inflammation (Meng et al., 2011; Borhani-Haghighi and Mohamadi, 2021). We have shown that BMAA promotes the proliferation of Nestin⁺ cells in primary NSCs culture. Hence, we could speculate this proliferation of undifferentiated cells could be due to the inflammatory process via TNF α in order to reduce inflammation.

Several neurotoxic mechanisms induced by BMAA have been put forward. Among these, BMAA has been characterized as a non-proteinogenic amino acid that can be misincorporated into proteins (Dunlop et al., 2013; Murch et al., 2004; Glover et al., 2014). This leads to endoplasmic reticulum stress and redox imbalance (Main et al., 2016). Nevertheless, pathways of BMAA-induced inflammation remain

to be explored. However, Silva et al. (2020) report BMAA exposure resulted in elevated TLR4 and TLR3 protein, and enhanced transcription of NLRP3 and pro-IL-1 β in cortical neurons. This augmenting effect of BMAA exposure provides the foundation for the hypothesis that BMAA induces neuroinflammation. Otherwise as an analog of glutamate, BMAA can activate mGluR which are expressed in astrocytes and microglia (Aronica et al., 1993). Interestingly, activation of mGluR5 significantly attenuates immunocompetent cells activation and reduces the LPS-induced response (Bhat et al., 2021; Byrnes et al., 2009). Considering that carbamylated forms of BMAA are analogues of glutamate, it would be interesting to study the effect of BMAA in a proinflammatory context. Further experiments are needed to determine if BMAA would increase or dampen the inflammatory response during a bacterial or viral inflammatory challenge.

5. Conclusions

Our study documents that BMAA-induced neuroinflammation. Here we demonstrated that BMAA has adverse effects on SVZ-derived populations and functions. We also highlighted that BMAA drives astrocytes and more drastically microglia cells into proinflammatory status. The proinflammatory effects of BMAA are one of the first steps in the BMAA toxicity cascade and result in the neuronal losses observed in the neuropathologies associated with this cyanotoxin. In fact, our study shows that BMAA disrupts neuroinflammation in our model of neural stem cells culture. These data support the hypothesis of Song et al. (2016) that release of neurotoxic mediators such as cytokines could induce motor neuron loss. Nevertheless, further studies are necessary to understand precisely the etiology of sporadic neurological diseases induced by pollutants such as BMAA, by paying particular attention to the exposure. Indeed, due to climate change and environmental anthropization, cyanobacterial blooms are becoming more frequent and thus the presence of BMAA increases worldwide (Havens et al., 2003; Heisler et al., 2008; Paerl and Otten, 2013). Considering the bioaccumulation of BMAA along the trophic chain, the present study supports that BMAA could be harmful for the brain, notably through neuroinflammation.

Funding

This work was supported by the National Research Agency (ANR NeuroTEM ANR-18-CE34-0006), European funding in Region Centre-Val de Loire (FEDER N°EX005756) and University of Orleans. Those funding had no role in study design, data collection, analysis and interpretation of data, writing of the paper, the decision to submit the article for publication.

CRedit authorship contribution statement

Sarah Méresse: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Vanessa Larrigaldie:** Investigation, Writing – review & editing. **Asma Oumadi:** Resources. **Vidian de Concini:** Investigation. **Séverine Morisset-Lopez:** Investigation. **Flora Reverchon:** Methodology, Writing – review & editing. **Arnaud Menuet:** Methodology, Writing – review & editing. **Céline Montécot-Dubourg:** Writing – review & editing. **Stéphane Mortaud:** Conceptualization, Methodology, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Article

Haslea ostrearia Pigment Marennine Affects Key Actors of Neuroinflammation and Decreases Cell Migration in Murine Neuroglial Cell Model

Sarah Méresse ¹, Hélène Gateau ², Tessa Tirnan ¹, Vanessa Larrigaldie ¹, Nathalie Casse ², Pamela Pasetto ³, Jean-Luc Mouget ², Stéphane Mortaud ¹ and Mostefa Fodil ^{2,*}

- ¹ Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires (INEM), UMR CNRS 7355, Université d'Orléans, 45071 Orléans, France
 - ² Biologie des Organismes, Stress, Santé, Environnement (BiOSSE), Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans, France
 - ³ Institut des Molécules et Matériaux du Mans, UMR CNRS 6283, Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, 72085 Le Mans, France
- * Correspondence: mostefa.fodil@univ-lemans.fr

Abstract: *Haslea ostrearia*, a cosmopolitan marine pennate diatom, produces a characteristic blue pigment called marennine that causes the greening of filter-feeding organisms, such as oysters. Previous studies evidenced various biological activities of purified marennine extract, such as antibacterial, antioxidant and antiproliferative effects. These effects could be beneficial to human health. However, the specific biological activity of marennine remains to be characterized, especially regarding primary cultures of mammals. In the present study, we aimed to determine in vitro the effects of a purified extract of marennine on neuroinflammatory and cell migratory processes. These effects were assessed at non-cytotoxic concentrations of 10 and 50 µg/mL on primary cultures of neuroglial cells. Marennine strongly interacts with neuroinflammatory processes in the immunocompetent cells of the central nervous system, represented by astrocytes and microglial cells. An anti-migratory activity based on a neurospheres migration assay has also been observed. These results encourage further study of *Haslea* blue pigment effects, particularly the identification of molecular and cellular targets affected by marennine, and strengthen previous studies suggesting that marennine has bioactivities which could be beneficial for human health applications.

Keywords: diatoms; *Haslea ostrearia*; marennine; biomolecules; neuroglial cells; neuroinflammation; migration; immunostimulation



Citation: Méresse, S.; Gateau, H.; Tirnan, T.; Larrigaldie, V.; Casse, N.; Pasetto, P.; Mouget, J.-L.; Mortaud, S.; Fodil, M. *Haslea ostrearia* Pigment Marennine Affects Key Actors of Neuroinflammation and Decreases Cell Migration in Murine Neuroglial Cell Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5388. <https://doi.org/10.3390/ijms24065388>

Academic Editors: Assunta Saide and Chiara Lauritano

Received: 24 February 2023

Revised: 6 March 2023

Accepted: 9 March 2023

Published: 11 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since a few decades, there has been an expanding interest in microalgae, notably due to their importance in aquatic ecosystems where they are responsible for most of the primary productivity. Indeed, microalgae form the basis of seafood webs and account for more than 50% of the oxygen produced yearly [1]. Those organisms involved not only in major ecosystem services but also in human health applications such as drug delivery, hypoxic tumor treatment and cancer therapy [2–6]. Due to their high metabolic flexibility, their ability to withstand various culture conditions, and their rapid growth, the number of studies on their use as a source of biologically valuable products has been rapidly increasing. For these reasons, the commercial production of bioactive compounds from microalgae is currently challenged by the biorefinery process. Currently, integrated microalgae cultivation technologies aimed at isolating biologically active substances from biomass, for cost-effective algae production, are being investigated. However, only a few strains of microalgae are actually exploited on an industrial scale [7].

On the one hand, microalgae are particularly valued as a source of antimicrobial, antiproliferative, anti-inflammatory, or antioxidant compounds [8–11]. On the other hand,

microalgae can be a source of hazardous molecules for human health, such as toxins [12,13]. The beneficial or harmful effects of molecules derived from microalgae seem to depend on the strain cultivated and the environment in which the microalgae biomass is produced.

A large number of marine compounds have been shown to affect a wide variety of cellular and molecular targets, notably within the nervous systems [14,15]. For instance, in the central nervous system (CNS), carotenoid extracts from *Euglena gracilis* strongly dampened microglia activation and downregulated the mRNA expression levels and release of proinflammatory mediators, including interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor-necrosis factor alpha (TNF α) in microglial cells [16]. In addition to that, an extract from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* mainly composed of fucoxanthin has been shown to inhibit NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation induced by lipopolysaccharide (LPS) in bone marrow-derived immune cells as well as in astrocytes. Moreover, fucoxanthin decreases the production of major proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6 and TNF α [17].

Haslea ostrearia is a cosmopolitan marine pennate diatom that can synthesize and release a water-soluble polysaccharidic blue-green pigment called marennine [18]. The name "marennine" was proposed by Lankester [19] in reference to Marennes-Oléron (Marennes, 45°49'25.8" N 1°06'16.3" W), a region of western France where oysters have been farmed for centuries. This pigment is responsible for the greening of oyster gills, a natural phenomenon of great importance for the oyster industry [20]. *Haslea ostrearia* is not only present on the French Brittany coasts but also within the Pacific Ocean on the Australian, American and Japanese coasts [21]. Until recently, green oysters were mainly consumed in France, but now they are also valued in these regions. Marennine is not involved in light capture or in photochemical activity [22], but it may confer photoprotective properties [23,24]. An ecological function can also be hypothesized due to allelopathic and antimicrobial effects exerted by marennine, thus giving *Haslea* cells a competitive advantage over other microalgae or bacteria [21,25].

At present, the complete bioactive potential of this pigment is still largely unknown. It has already been described that aqueous extracts containing marennine exhibited anti-coagulant properties using human plasma [26]. This study also reported that marennine displayed in vitro growth-inhibiting properties of Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) in Vero cells [26]. Gastineau et al. [27] confirmed the antiviral effects of purified marennine against the HSV-1 herpes virus with an EC50 of 27 μ g/mL, which was twice as effective as the reference drug Zovirax. Moreover, marennine has demonstrated anti-oxidative effects superior to strong anti-oxidative molecules, such as ascorbic acid and Trolox, usually used in the food industry [24]. In the context of anti-cancer therapies, different marennine forms varying in the purification methodology have demonstrated an anti-proliferative effect on human cancer cell lines, such as SKOV-3 (ovarian cancer), SW116 (colon cancer) or M113 (melanoma) [27,28]. These pioneer studies highlighted the potential of marennine as a biologically active organic compound for carcinotherapy, but they were carried out only on tumor cell models.

The present work aimed to investigate the effects of marennine on primary culture cellular models, focusing particularly on the immunocompetent cells of the CNS. To this end, the impact of marennine exposure at 10, 50 and 100 μ g/mL on murine primary culture of astrocytes and microglial cells was investigated to check for possible effects on cell viability. In order to determine if marennine acts on neuroinflammatory processes, its effect was investigated at the level of gene expression, focusing on the main inflammatory cytokines. The inflammatory status of populations of immunocompetent cells, astrocytes and microglial cells was also determined following exposure to marennine. Lastly, the effect of marennine was assessed on proinflammatory cytokine release IL-1 β , IL-6, TNF α and on the anti-inflammatory cytokine interleukine-10 (IL-10).

2. Results

2.1. Marennine Is Not Cytotoxic at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

The effect on cell viability of marennine at 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was determined in co-culture of astrocytes and microglial cells. This was evaluated after 24 h and 48 h of exposure. Marennine did not affect the cell viability at 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 1A,B). At 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, however, results showed that marennine decreased cell viability by ca. 75% after 24 h (Figure 1A) and 85% after 48 h (Figure 1B). To prevent cytotoxic effects in further experiments, the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was excluded.

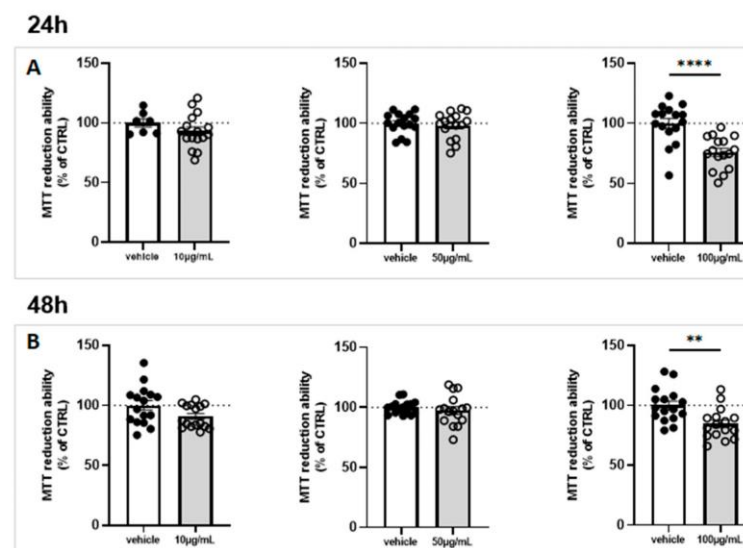


Figure 1. Effects of 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of marennine concentration on cell viability in neuroglial cell culture. Cell viability was determined using MTT assay. (A) After 24 h and (B) after 48 h of marennine exposure. For a 24 h exposure, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 7$, marennine $n = 16$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 16$, marennine $n = 16$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 16$, marennine $n = 16$. For a 48 h exposure, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 16$, marennine $n = 16$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 16$, marennine $n = 16$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 16$, marennine $n = 16$. Values represent mean \pm SEM. Statistical differences from control are indicated as follows: ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ using Mann–Whitney test.

2.2. Marennine Induces an Upregulation of Immunomodulatory Genes

The effect of marennine at 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations was tested on gene expression involved in the neuroinflammatory process. At 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, marennine induced a strong upregulation of proinflammatory genes *Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf α* and of the anti-inflammatory gene *Il-10* after 24 h of exposure (Figure 2A), and an upregulation only for *Il-1 β* gene expression (Figure 2B) after 48 h. It is worth noting that the upregulation of both proinflammatory and anti-inflammatory genes after 24 h of treatment was more significant than after 48 h. At 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, marennine exposure resulted in a strong upregulation of the proinflammatory genes *Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf α* and of the anti-inflammatory gene *Il-10* (Figure 2C). The effects were less significant than at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

After 48 h of treatment, the modulation of gene expression was lower than after 24 h of marennine exposure, but *Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf α* and *Il-10* remained upregulated (Figure 2D). The upregulation of inflammatory genes depends on the concentration and duration of treatment.

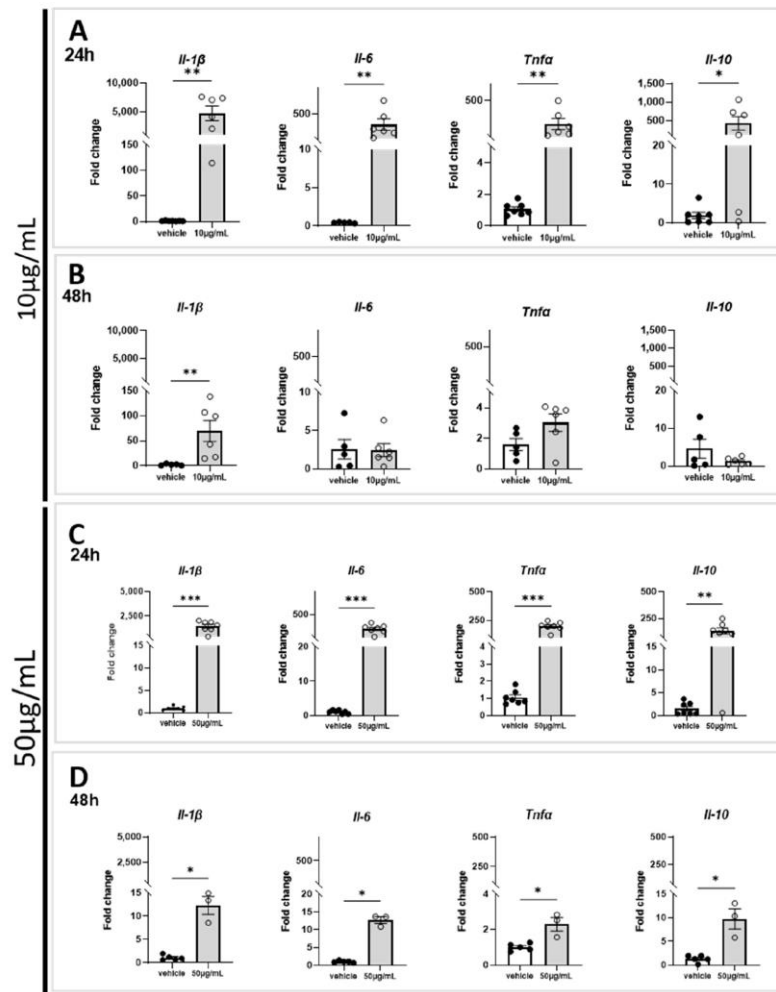


Figure 2. Effects of 10 and 50 µg/mL of marennine on gene expression in astrocytes and microglial cells after 24 h and 48 h of treatment. Levels of gene expression *Il-1β*, *Il-6*, *Tnfa* and *Il-10* after marennine exposure were measured by RT-qPCR. (A) After 24 h of marennine with 10 µg/mL. (B) After 48 h of marennine with 10 µg/mL. (C) After 24 h of marennine with 50 µg/mL. (D) After 48 h of marennine with 50 µg/mL. At 10 µg/mL, for 24 h *Il-1β*: vehicle n = 5, marennine n = 6; *Il-6*: vehicle n = 7, marennine n = 6; *Tnfa*: vehicle n = 7, marennine n = 6; *Il-10*: vehicle n = 7, marennine n = 6. For 48 h *Il-1β*: vehicle n = 5, marennine n = 6; *Il-6*: vehicle n = 5, marennine n = 6; *Tnfa*: vehicle n = 5, marennine n = 6; *Il-10*: vehicle n = 5, marennine n = 6. 50 µg/mL, for 24 h *Il-1β*: vehicle n = 7, marennine n = 7; *Il-6*: vehicle n = 7, marennine n = 7; *Tnfa*: vehicle n = 7, marennine n = 7; *Il-10*: vehicle n = 7, marennine n = 7. For 48 h *Il-1β*: vehicle n = 5, marennine n = 3; vehicle n = 5, marennine n = 3; *Tnfa*: vehicle n = 5, marennine n = 3; *Il-10*: vehicle n = 5, marennine n = 3. Values represent mean ± SEM. Statistical differences from the control are indicated as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ using Mann–Whitney test.

2.3. Marennine Affects the Population of Immunocompetent Cells of the CNS

As astrocytes and microglial cells are considered the main actors of the neuroinflammatory process, the effect of marennine on these cell models was assessed after 24 h and 48 h of treatment at 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3.1. Marennine Modifies the Inflammatory Status without Affecting the Total Amount of Astrocyte Cells

ACSA2 (astrocyte cell surface antigen-2) staining was used to label astrocyte cell types. To investigate the activation status of those immunocompetent cells, CD86 was used as a costimulatory marker of proinflammatory status, and the mannose receptor CD206 was used as a marker of the anti-inflammatory status. At 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, following 24 h and 48 h of exposure, marennine did not affect the percentage of astrocyte populations represented by the ACSA2 positive cells on the total amount of cells, nor did it affect their activation status, as illustrated by the ratio $\text{CD86}^+/\text{CD206}^+$ (Figures 3A and 4A). At 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, following 24 h of exposure, marennine still did not affect the percentage of astrocyte populations. Nevertheless, a proinflammatory status in the astrocyte populations was observed (Figure 3C). After 48 h of treatment, the population was not impacted, and the anti-inflammatory process took place (Figure 4C).

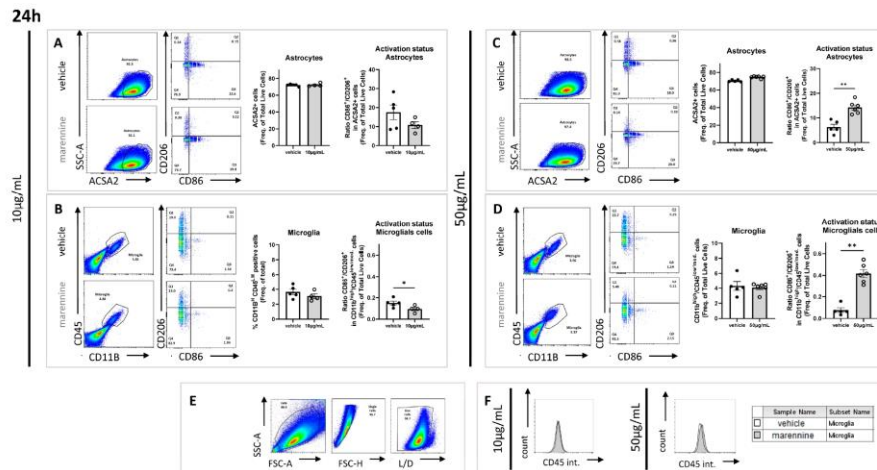


Figure 3. Effects of 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of marennine on astrocytes and microglial cells after 24 h of exposure. (A) Astrocytes were gated as ACSA2 positive; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after exposure to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ marennine. (B) Microglial cells were gated as $\text{CD11b}^{\text{high}}$ and $\text{CD45}^{\text{low/medium}}$; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after exposure to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ marennine. (C) Astrocytes were gated as ACSA2 positive; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after marennine exposure at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (D) Microglial cells were gated as $\text{CD11b}^{\text{high}}$ and $\text{CD45}^{\text{low/medium}}$; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after marennine at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (E) Cell populations and activation status were determined by flow cytometry. A gate was first created on non-debris populations, excluding very low SSC/FSC events; cells are then gated on single cells and selected by Live/Dead staining. (F) Quantification of CD45 intensity after a marennine of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (left) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (right). For 24 h, at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 5$, marennine $n = 4$. At 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vehicle $n = 5$, marennine $n = 6$. Values represent mean \pm SEM. Significant differences from control are indicated as follows: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ using Mann-Whitney test.

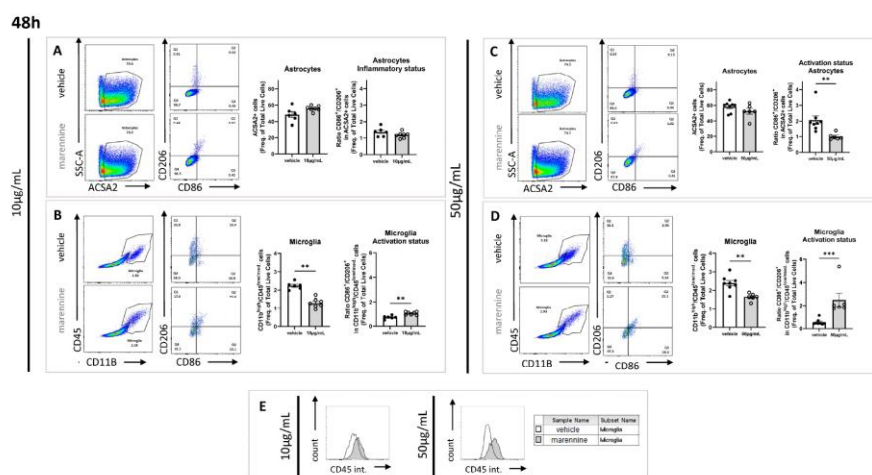


Figure 4. Effects of 10 and 50 µg/mL of marennine in astrocytes and microglial cells after 48 h of exposure. (A) Astrocytes were gated as ACSA2 positive; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after exposure to marennine at 10 µg/mL. (B) Microglial cells were gated as CD11b^{high} and CD45^{low/medium}; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after exposure to marennine at 10 µg/mL. (C) Astrocytes were gated as ACSA2 positive; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after exposure to marennine at 50 µg/mL. (D) Microglial cells were gated as CD11b^{high} and CD45^{low/medium}; activation status was determined through CD86 and CD206 staining after exposure to marennine at 50 µg/mL. (E) Quantification of CD45 intensity after a marennine of 10 µg/mL (left) and 50 µg/mL (right). For 24 h, at 10 µg/mL vehicle n = 6, marennine n = 7. At 50 µg/mL vehicle n = 8, marennine n = 6. Values represent mean ± SEM. Statistically differences from control are indicated as follows: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ using Mann-Whitney test.

2.3.2. Marennine Modifies the Inflammatory Status and Modulates the Total Amount of Microglial Cells

CD11b and CD45 staining was used to study microglial cell responses. As for astrocytes, their activation status was investigated using CD86 as a marker of proinflammatory status and CD206 as a marker of anti-inflammatory cells. After 24 h exposure to 10 µg/mL marennine, no effect was observed on the microglial cell population percentage (Figure 3B), however microglial cells showed an anti-inflammatory response (Figure 3B). Following 48 h of exposure, marennine decreased the populations of microglial cells and the macrophages displayed proinflammatory status (Figure 4B). The effect of marennine on neuroinflammation seems to depend on the exposure duration. At 50 µg/mL and after 24 h of exposure, the percentage of microglial cell populations was not affected by marennine, and the activation status seems more likely to be proinflammatory (Figure 3D). After 48 h of exposure to marennine, microglial cells remained in proinflammatory status, with a decrease in the population (Figure 4D). Moreover, the intensity of the staining of CD45 in the population of microglial cells exposed to marennine was higher (Figures 3B,D and 4B,D) and its shifts means that the phenomenon is time and concentration dependent (Figures 3F and 4E).

2.4. Marennine Induces a Release of Key Actors of Neuroinflammation

This series of experiments was aimed to determine the effect of marennine at concentrations of 10 and 50 µg/mL on the release of inflammatory cytokines, in particular the key proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α . Furthermore, the release of IL-10 was to be evaluated to assess the anti-inflammatory response. No significant modification in IL-1 β release was observed at any marennine concentration or exposure duration (Figure 5A–D).

In contrast, a significant release of IL-6 and TNF α was observed in the supernatant, which increased with marennine concentration and exposure duration, whereas they were undetectable in the vehicle condition (Figure 5A–D). The concentration of IL-10 was hardly detectable in the supernatants (Figure 5A–C), except for a massive release observed at the highest concentration and the longest exposure (Figure 5D). Thus, the release of both proinflammatory and anti-inflammatory cytokines is dependent on marennine concentration and duration of exposure, with the highest released observed at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 48 h of treatment.

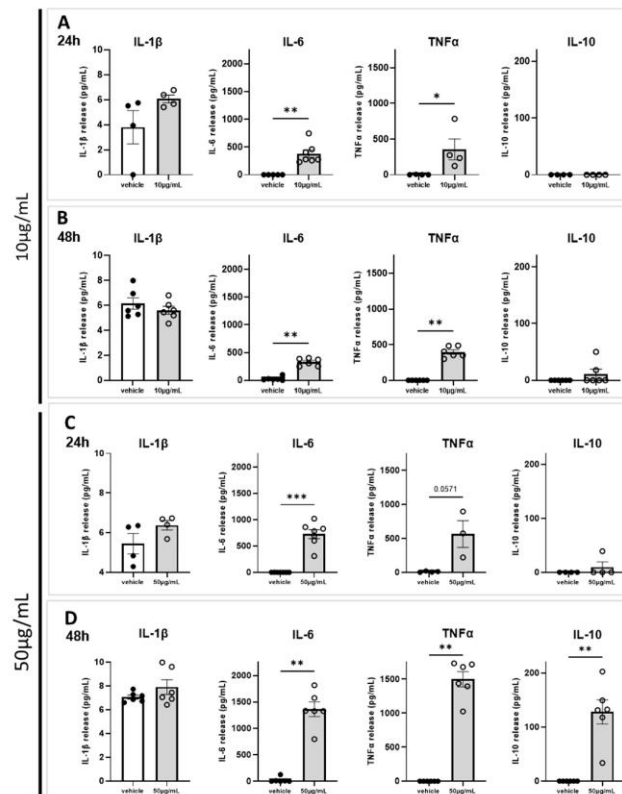


Figure 5. Effects of 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of marennine on cytokine release in astrocytes and microglial cells after 24 h and 48 h of treatment. Levels of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF α and IL-10 release in the supernatant after treatment were measured by ELISA-assay. (A) After 24 h of treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) After 48 h of treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (C) After 24 h of treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (D) After 48 h of treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for 24 h IL-1 β : vehicle n = 4, marennine n = 4; IL-6: vehicle n = 5, marennine n = 7; TNF α : vehicle n = 4, marennine n = 4; IL-10: vehicle n = 4, marennine n = 4. For 48 h IL-1 β : vehicle n = 6, marennine n = 6; IL-6: vehicle n = 6, marennine n = 6; TNF α : vehicle n = 6, marennine n = 6; IL-10: vehicle n = 6, marennine n = 6. At 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for 24 h IL-1 β : vehicle n = 4, marennine n = 4; IL-6: vehicle n = 7, marennine n = 7; TNF α : vehicle n = 4, marennine n = 3; IL-10: vehicle n = 4, marennine n = 4. For 48 h IL-1 β : vehicle n = 6, marennine n = 6; IL-6: vehicle n = 6, marennine n = 6; TNF α : vehicle n = 6, marennine n = 6; IL-10: vehicle n = 6, marennine n = 6. Values represent mean \pm SEM. Significant differences from control are indicated: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ using Mann–Whitney test.

2.5. Marennine Reduces the Migration Surface of Cells from Neurospheres without Inducing Cytotoxicity

Three-dimensional culture models are increasingly used in research for the study of the nervous system. These models are closer to reality and demonstrate less sensitivity to treatment due to their organization [29]. Moreover, cerebral organoids allow for higher differentiation of NSCs, notably into differentiated astrocytes. The neurospheres migration assay is a useful *in vitro* bio-tool that reveals the neural cell migration process [30]. In the present work, the neurosphere migration assay demonstrated that exposure to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of marennine did not affect either the viability or the size of cerebral organoids (Figure 6A,B). Furthermore, a significant reduction of the cell migration area (around 50%) was observed for the 48 h of treatment (Figure 6D).

48h

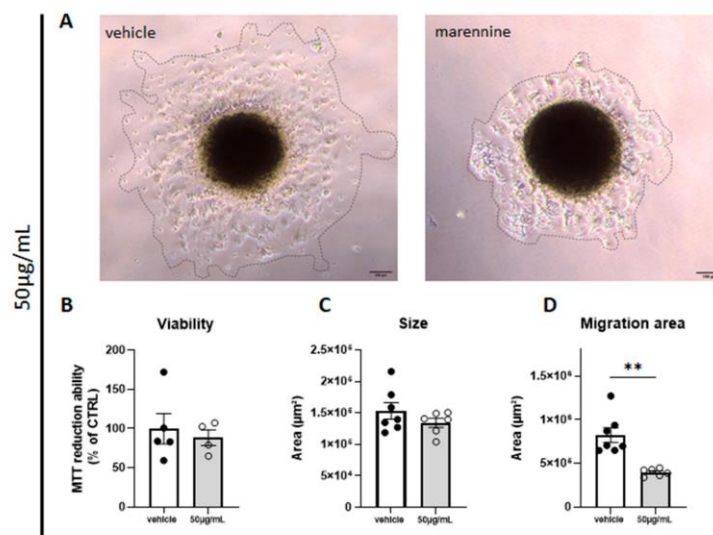


Figure 6. Effects of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ marennine on cell migration after 48 h exposure. (A) Representative images were taken using a 10 \times objective of a phase-contrast microscope; the outer dark circles in the phase-contrast images indicate the area covered by the migrated cells. (B) Cell viability was determined using MTT assay; vehicle $n = 5$, marennine $n = 4$. (C) Quantification of neurosphere size after migration; vehicle $n = 7$, marennine $n = 6$. (D) Quantification of the migration area covered by migrating cells from the core of the neurosphere; vehicle $n = 7$, marennine $n = 6$. Scale bar = 100 μm . Values represent mean \pm SEM. Significant differences from control are indicated: ** $p < 0.01$.

3. Discussion

Astrocytes are the most abundant glial cells in the CNS, maintaining homeostasis and supporting the function of neurons through trophic and metabolic support [31]. Meanwhile, microglial cells are considered as the resident macrophages of the brain [32]. Both cell types strongly interact with each other and are considered as the immunocompetent cells regarding their capacity to mediate immune responses.

In Th1-type immune responses, the key proinflammatory cytokines are represented by IL-1 β , IL-6 and TNF α , which play a critical role in modulating the immune system. Th2-type immune responses, known to be anti-inflammatory, are notably characterized by the production of IL-10 cytokines [33,34]. TNF α , initially discovered as a result of its antitumor activity, has been shown to be one of the major mediators of inflammation [35]. However,

it has been demonstrated in a TNFR-deficient mice model that TNF α acts to dampen the inflammatory response and plays a role in the repair process of inflammation [36,37]. While TNF α can be produced by both astrocytes and microglial cells, IL-6 and IL-1 β are mainly released by astrocytes and microglial cells, respectively. Since crosstalks between microglial cells and astrocytes are crucial for the behaviors of both cell types, a primary co-culture of those inflammatory cells is more representative of physiological condition than immortalized monoculture cell lines [38].

In the present study, the quantification of cytokines release illustrated the time- and concentration-dependent effects of marennine on neuroinflammatory processes. In particular, co-cultures of astrocytes and microglial cells demonstrated that marennine at non-cytotoxic concentrations induces an upregulation of both proinflammatory (*Il-1 β* , *Il-6*, *Tnfa*) and anti-inflammatory (*Il-10*) genes. The inflammatory response at the gene expression level was higher at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ than at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 24 h of exposure. After 48 h of treatment, a significant upregulation of *Il-1 β* at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can be noticed, and at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the response induced by marennine also involved *Il-6*, *Tnfa* and *Il-10*. These results suggest that the expression of *Il-1 β* is differentially regulated compared to other inflammatory genes after marennine exposure. Moreover, despite strong upregulation of *Il-10* gene expression, this cytokine can only be detected in the supernatant at the highest concentration and longest exposure to marennine. Hence, we showed for the first time that *Haslea* blue pigment activates the inflammatory pathway and interacts with glial cells of the CNS. Given the importance of marennine for the aquaculture industry, the temporal kinetics of both pro- and anti-inflammatory signaling after marennine exposure will be studied further. For instance, the heterogeneous kinetics of the immune response following a neuroinflammatory injury has already been described in vitro using the RAW 264.7 macrophages cell line [39]. These authors also reported that the proinflammatory-like response began as soon as 1 h after LPS exposure, whereas anti-inflammatory responses, represented by IL-10, started 10 h after LPS-induced inflammation [39]. As a reminder, LPS is a bacterial endotoxin that specifically promotes the production and release of inflammatory cytokines [40].

It has to be noted that despite upregulation of the *Il-1 β* gene following 24 h and 48 h of treatment at 10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no significant difference in cytokine release can be observed. This can be due to notable IL-10 upregulation leading, as an anti-inflammatory cytokine, to the inhibition of IL-1 β synthesis [41,42]. This can also be explained by smaller proportions of microglial cells in culture, when compared to basal release in the control condition. Indeed, in the flow cytometry experiments, microglial cells represented less than 4% of the total population of neuroglial cells, which is close to in vivo conditions in the mammalian brain [43]. Yet, we have to take into account that for the release of IL-1 β into extracellular space, pro-IL-1 β needs to be cleaved by the protease caspase-1 [44]. The activation of caspase-1 occurs via recruitment to a multi-protein complex termed the inflammasome, especially involving the NLRP3 protein. To further study the difference in IL-1 β response, the effective synthesis of pro-IL-1 β , then the mechanisms of its release, should be investigated at the molecular level.

If conflicting reports exist about the capacity of microglial cells to produce IL-10, astrocytes are known to respond to IL-10 and then attenuate microglial activation [45–47]. We thus aimed at determining the effects of marennine on immunocompetent cell populations and activation. The activation status of these immunocompetent cells is referred to as the balance ratio between CD86⁺ and CD206⁺ [48,49]. Whatever marennine concentration, no harmful effect could be observed after 24 h of exposure, neither on astrocytes nor microglial cell population, at 10 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nevertheless, a non-canonical effect of marennine on the inflammatory status can be hypothesized. On the one hand, a balance more likely toward an anti-inflammatory status at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ is observed in the microglial population; on the other hand, the balance ratio at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indicates an activation facing proinflammatory processes. After 48 h of exposure, this population decreased at all concentrations, and a proinflammatory status is developed. Concerning astrocytes, the main glial cells responsible for the homeostasis of the CNS, the percentage of the population is

not affected at both concentrations, whatever the exposure duration. Based on the balance ratio between CD86⁺ and CD206⁺, at 50 µg/mL marennine exposure, a proinflammatory status is first observed during the first 24 h, shifting to an anti-inflammatory status after 48 h. These results underline that following an *in vitro* treatment with marennine, the two main types of immunocompetent CNS cells do not have the same kinetics and the same inflammatory responses. This can be supported by the fact that activated microglial cells and reactive astrocytes may achieve immune “stimulation” through mutual communication and cooperation in neuroinflammation [45].

Activated and resting microglia can be separated based on relative levels of CD45 expression. Moreover, *in vivo* studies have demonstrated that minocycline, an anti-inflammatory treatment of the CNS, significantly reduced the percentage of CD45^{high} microglia [50]. Nevertheless, *in vitro* studies using human or rodent cells suggest that CD45 can downregulate microglial activation [51]. For example, murine microglia devoid of CD45 expression demonstrate an over-activated phenotype [52,53]. CD45 also downregulates HIV-1 replication in microglia, suggesting a neuroprotective effect [51]. CD45 staining appears to be a biomarker of proinflammatory status leading to the establishment of neuroprotective inflammatory response. In this study, we demonstrate an increase in the intensity of CD45 staining in a concentration- and time-dependent manner. However, we have to keep in mind the establishment of an anti-inflammatory response, after 48 h of exposure, mediated by IL-10.

Proliferating progenitor cells and glial cells tend to migrate from the neurogenic niches toward their final destination in the brain. Previous studies have shown that inflammation can disturb neuronal and non-neuronal cells migration and thus disrupt neurodevelopment [54,55]. This alteration can also favor the onset of neurodegenerative diseases later in life [56]. Our results demonstrate that a purified extract of marennine strongly inhibits cell migration in a 3D neurosphere model. It is known that inhibition of cell migration from neurogenic niches in response to environmental compounds exposure has been correlated with cytoskeletal disruption [57]. This could be of great importance, as few anti-cancer drugs are known to target the cytoskeleton to fight against metastatic dissemination such as snake toxins [58] and vincristine, an alkaloid extracted from Madagascar periwinkle [59]. Moreover, while a cascade of cytokines can be beneficial for the host by initiating the inflammatory response, a dysregulation of the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators can be deleterious. Here, we highlight an immunostimulatory effect of marennine, knowing that the pro-inflammatory status can be linked to neurotoxic effects, while the anti-inflammatory status is generally associated with neuroprotective effects [56].

4. Materials and Methods

4.1. Animals

C57BL/6J mice (Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France) were housed in a temperature- and humidity-controlled environment on a 12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water.

4.2. Cultivation of Microalgae and Marennine Extraction

Haslea ostrearia diatoms used for biomass production and pigment extraction were derived from samples collected in Bourgneuf Bay, France (46°59'19" N/2°14'14" W). The blue pigment was extracted and purified as previously described [60]. To sum up, *Haslea ostrearia* strain Nantes Cultures Collection (NCC) 495 was cultured at 16 ± 1 °C, with an irradiance of 100 µmol·m⁻²·s⁻¹ provided by Philips TLD 36 W/965 fluorescent tubes with an alternance cycle of 14 h light/10 h dark. Cultures were grown with autoclaved artificial seawater, prepared from a commercial sea salt mix (Instant Ocean, Aquarium Systems®, Mentor, OH, USA), pH 7.6 ± 0.2, salinity 32 ppm, with an enrichment solution as described by Mouget et al. [61].

The culture medium was then filtered through 15 µm and 1.4 µm paper filters (Grosseron, Coueron, France) to remove residues. A specific precipitation method was followed, using acid and base according to the procedure described in the patent n° (FR2019/052933), to concentrate the filtered supernatant. The blue precipitate formed was gathered by centrifugation (4000 rpm, for 5 min) and dissolved with formic acid. The blue concentrated extract was dialyzed, and the deep blue retentate was further purified. The marennine, which interacted with the C-18 cartridge, was recovered with a water-ethanol 1:1 mixture. The mixture was then evaporated in order to recover the purified extract of marennine as a dry powder, which was then solubilized with sterile water at a stock concentration of 1 mg/mL. Purified pigment was stored, protected from light, at 4 °C.

4.3. Neuroglial Cell Culture and Marennine Exposure

In vitro murine primary cultures of astrocytes and microglial cells were performed from postnatal days 1 to days 3 C57BL/6J mice. Neuroglial cells were cultured according to the modified experimental procedures of Schildge and colleagues [62]. Four to eight male and female brains were used to perform each cell culture. Briefly, to obtain a single-cell suspension, the olfactory bulbs and the cerebellum were removed, and the meninges were peeled off. The dissected telencephalon was mechanically dissociated. The cells were then resuspended in DMEM medium D5671 (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), completed with 10% FBS (GE Healthcare HyClone, Logan, UT, USA), 1000 units/mL Penicillin-Streptomycin 15070-063 (Gibco, Waltham, MA, USA) and 2 mM of L-Glutamine 25030-024 (GIBCO, Waltham, MA, USA). Cells were enumerated and plated on appropriate plates, and then maintained in cultures at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified incubator. The first change of medium was after four days of culture, and then each two days. Cells were treated with marennine at 10, 50 and 100 µg/mL during 24 h and 48 h.

4.4. Neuroglial Cell Viability Analysis

Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-yl)2,2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide M2003 (MTT, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) assay. Viability was measured after 24 h and 48 h of treatment in the primary co-culture of astrocytes and microglial cells. Briefly, cells were plated at 4×10^4 cells per well in 96-well plates. At the end of exposure, MTT was added to the medium at a concentration of 5 mg/mL and incubated at 37 °C for three hours. The formazan product generated was solubilized in dimethyl sulfoxide for 15 min and measured at 570 nm using a microplate reader (ClarioStar, BMG LABTECH, Cary, NC, USA).

4.5. Gene Expression Analysis

Quantitative PCR was used to quantify gene expression. Gene mRNA expressions were performed using GoTaq[®]qPCR Master Mix A5002 (Promega, Madison, WI, USA). Reverse transcription of RNA into cDNA was carried out with GoScript Reverse Kit A5001 (Promega, Madison, WI, USA). RT-qPCR was performed with Fast SYBR Green master mix on an ARIA MX (Stratagene MX3005P, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). All primer sequences used were from Qiagen (Valencia, CA, USA): *Il-6* (#QT00098875), *Il-10* (#QT00106169), *Tnfα* (#QT00104006) and *Il-1β* (#QT01048355). RNA expression was normalized to *18S* expression (#QT02448075) and *β-actin* (#QQT00095242). Data were analyzed using the comparative analysis of relative expression by $\Delta\Delta C_t$ methods. For all experiments, biological triplicate and technical triplicate were performed.

4.6. Neuroglial Cell Populations and Activation Status Analysis

Firstly, flow cytometry was used to determine the effect of the blue pigment marennine on the population of the immuno-competent cells of the CNS, astrocytes and microglial cells. Second, we determined the activation status of those cells. Cells were plated at 1×10^5 cells per well in 6-well plates. After 24 h and 48 h of exposure, cells were collected and stained with extracellular conjugated antibodies: Fixable Viability Dye 65-0865-14,

1/800 (eBiosciences™, San Diego, CA, USA), anti-ACSA2 APC 130-117-386, 1:50 (MILTENYI Biotec, Bergisch Gladbach,), anti-CD45 V450 560501, 1:100 (BD Horizon™, San Jose, CA, USA), anti-CD11b PerCP/Cy5 560993, 1:100 (BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA), anti-CD86 FITC 561961, 1:100 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and anti-CD206 PE-Cy7 141720, 1:100 (BioLegend, San Diego, CA, USA™). Non-conjugated anti-CD16/32 antibody 553142, 1:100 (BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA) was used to block non-specific Fc receptors for 20 min at 4 °C. Then, cells were washed and resuspended in a lysis solution (BD FACS™ Lysing Buffer, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and maintained at 4 °C before acquisition the following day. Data were collected with a flow cytometer (BD FACSCanto II, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) and analyzed with FlowJo v10 software® (Tree Star, Ashland, OR, USA). Very low SSC and very low FSC were considered as cellular debris and excluded to define the populations of interest. ACSA2+ cells were considered as astrocytes. CD11b^{high-medium}/CD45^{low} cells were gated as microglial cells. Activation status was determined using CD86 as a costimulatory marker of proinflammatory status and man-nose receptor CD206 as a marker of anti-inflammatory status [63]. To illustrate the balance between proinflammatory and anti-inflammatory status, we represented the balance ratio of CD86⁺/CD206⁺. For all experiments, at least three biological replicates were performed.

4.7. Measurement of Cytokine Release

For cytokine release determination, supernatants from astrocytes and microglial cell cultures were taken after 24 h and 48 h of exposure. Extracellular ATP was added at 100 µM during 30 min to stimulate IL-1β secretion. Samples were stored at −20 °C until analyzed. Release of cytokines was analyzed by ELISA assay kits for murine IL-1β, IL-6, TNFα and IL-10 (R&D system, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions. For all experiments, at least three biological replicates and three technical replicates were performed.

4.8. Neurospheres Migration Assay

Neural stem cells (NSCs) composing the neurospheres were cultured using adapted protocols [64,65]. Cell viability was assessed using the MTT assay from adapted protocols of Bresciani et al. [66]. NSCs were first proliferated in standard DMEM medium supplemented with epidermal growth factors E9644 (EGF, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) until confluence was reached (about 5–6 days). Cells were detached using Trypsin-EDTA 25200-056 (Gibco, Waltham, MA, USA) and seeded in 96-well Corning Ultra low attachment plates 7007 (Corning Inc., Corning, NY, USA) at 1.25×10^6 cells. The medium was changed every two days by removing half of the medium, and the plates were shaken at 150 rpm for 10 min before adding fresh DMEM medium enriched with EGF. Once neurospheres were well-formed, the medium was replaced with DMEM/F12 21331-020 (Gibco, Waltham, MA, USA) containing 1% P/S supplemented with 1% N2 17502-048 (Gibco, Waltham, MA, USA) to allow differentiation into neuroglial cells. Neurospheres were then transferred into a 24-well plate with a glass coverslip coated with Poly-L-Lysine P7405 (PLL, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) and matrigel® 356237 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) to allow migration.

Attached neurospheres were non-exposed (vehicle condition) or treated with 50 µg/mL of a purified extract of marennine from *Haslea ostrearia* during 48 h. These conditions correspond to the highest values of concentration and exposure duration used on 2D cultures. Phase-contrast photographs of each well were taken by a microscope using a 10× objective (Nikon ECLIPSE TS2, Nikon Inc., Melville, NY, USA). Measurements were performed according to the protocol previously described [67]. Briefly, to assess the size of each neurosphere, the area was measured. To determine the migration of cells, we measured the area covered by migrated cells using the Image J® software (NIH Image, Bethesda, MD, USA [68]).

4.9. Statistics

The results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) for each experimental group. Each point corresponds to biological replicates. Assuming that our data did not follow the normal law of distribution, differences compared with the control group were analyzed by Mann–Whitney tests for non-parametric data using GraphPad Prism 9[®] (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). *p*-values \leq 0.05 were considered statistically significant.

5. Conclusions

Marennine has been highlighted in previous studies as a potential biologically active compound that can be benefit in pathological context [23,24,27,69]. In the present study, we demonstrated, for the first time, that marennine has a time- and concentration-dependent significant effect on dynamic changes of neuroinflammatory processes. These findings suggest an interesting role of marennine in immunomodulation by regulating intercellular communications between astrocytes and microglial cells. Nevertheless, *in vivo* experiments are needed to study the temporal kinetics of both pro- and anti-inflammatory signaling after marennine exposure and determine its physiological effects on the mammalian CNS. Marennine also exhibits an anti-migratory property. This could be of great interest when studying marennine bioactivities on cancer development, metastasis dissemination and angiogenesis. These preliminary results pave the way for further investigations in order to identify molecular and cellular targets of marennine and reinforce previous studies suggesting that marennine has promising bioactivities that could be beneficial for human health applications.

Author Contributions: Conceptualization: S.M. (Sarah Méresse), S.M. (Stéphane Mortaud) and M.F.; Methodology: S.M. (Sarah Méresse), H.G., V.L., S.M. (Stéphane Mortaud) and M.F.; Resources: S.M. (Sarah Méresse) and H.G.; Formal analysis: S.M. (Sarah Méresse); Investigation: S.M. (Sarah Méresse), H.G. and T.T.; Supervision: S.M. (Stéphane Mortaud) and M.F.; Writing—original draft: S.M. (Sarah Méresse) and M.F.; Writing—review & editing: S.M. (Sarah Méresse), P.P., J.-L.M., S.M. (Stéphane Mortaud) and M.F.; Project administration: S.M. (Stéphane Mortaud) and M.F.; Funding acquisition: N.C., P.P., J.-L.M., S.M. (Stéphane Mortaud) and M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the Horizon 2020 Research and Innovation Program GHANA (The Genus Haslea, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture) under Grant Agreement No 734708/GHANA/H2020-MSCA-RISE-2016 and a postdoctoral co-funding from Le Mans University and the regional program of scientific dynamics “Atlantic Microalgae (AMI)”, Pays de la Loire region. This work was also supported by the European funding in Region Centre-Val de Loire (FEDER N°EX016008 TARGET-EX) and University of Orléans.

Institutional Review Board Statement: Animal care and experimentation were in accordance with the European Communities Council directive (2010/63/EU) and the French Minister under APAFIS#21860.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Experimental data are available from the authors upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Chapman, R.L. Algae: The World’s Most Important “Plants”—An Introduction. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* **2013**, *18*, 5–12. [CrossRef]
2. Barkia, I.; Saari, N.; Manning, S.R. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 304. [CrossRef]
3. Qiao, Y.; Yang, F.; Xie, T.; Du, Z.; Zhong, D.; Qi, Y.; Li, Y.; Li, W.; Lu, Z.; Rao, J.; et al. Engineered Algae: A Novel Oxygen-Generating System for Effective Treatment of Hypoxic Cancer. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba5996. [CrossRef]

4. Li, G.; Chang, X.; Luo, X.; Zhao, Y.; Wang, W.; Kang, X. Fucoxanthin Induces Prostate Cancer PC-3 Cell Apoptosis by Causing Mitochondria Dysfunction and Oxidative Stress. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2021**, *41*, 953–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Nurcahyanti, A.D.R.; Kusmita, L.; Wink, M. Bixin and Fucoxanthin Sensitize Human Lung Cancer and Cervical Cancer Cell to Cisplatin in Vitro. *BMC Res. Notes* **2021**, *14*, 454. [[CrossRef](#)]
6. Zhang, D.; Zhong, D.; Ouyang, J.; He, J.; Qi, Y.; Chen, W.; Zhang, X.; Tao, W.; Zhou, M. Microalgae-Based Oral Microcarriers for Gut Microbiota Homeostasis and Intestinal Protection in Cancer Radiotherapy. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1413. [[CrossRef](#)]
7. Benemann, J.R.; Woertz, I.; Lundquist, T. Autotrophic Microalgae Biomass Production: From Niche Markets to Commodities. *Ind. Biotechnol.* **2018**, *14*, 3–10. [[CrossRef](#)]
8. Dolganyuk, V.; Belova, D.; Babich, O.; Prosekov, A.; Ivanova, S.; Katserov, D.; Patyukov, N.; Sukhikh, S. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Coulombier, N.; Jauffrais, T.; Lebouvier, N. Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sorrenti, V.; Castagna, D.A.; Fortinguerra, S.; Burianni, A.; Scapagnini, G.; Willcox, D.C. Spirulina Microalgae and Brain Health: A Scoping Review of Experimental and Clinical Evidence. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Mohibbullah, M.; Haque, M.N.; Sohag, A.A.M.; Hossain, M.T.; Zahan, M.S.; Uddin, M.J.; Hannan, M.A.; Moon, I.S.; Choi, J.-S. A Systematic Review on Marine Algae-Derived Fucoxanthin: An Update of Pharmacological Insights. *Mar. Drugs* **2022**, *20*, 279. [[CrossRef](#)]
12. Morabito, S.; Silvestro, S.; Faggio, C. How the Marine Biotoxins Affect Human Health. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 621–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kim, S.-Y.; Rasmussen, U.; Rydberg, S. Effect and Function of β -N-Methylamino-L-Alanine in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Sci. Total Environ.* **2022**, *830*, 154778. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mayer, A.; Rodríguez, A.; Tagliatalata-Scafati, O.; Fusetani, N. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2510–2573. [[CrossRef](#)]
15. Hannan, M.A.; Dash, R.; Haque, M.N.; Mohibbullah, M.; Sohag, A.A.M.; Rahman, M.A.; Uddin, M.J.; Alam, M.; Moon, I.S. Neuroprotective Potentials of Marine Algae and Their Bioactive Metabolites: Pharmacological Insights and Therapeutic Advances. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 347. [[CrossRef](#)]
16. Piovan, A.; Filippini, R.; Corbioli, G.; Costa, V.D.; Giunco, E.M.V.; Burbello, G.; Pagetta, A.; Giusti, P.; Zusso, M. Carotenoid Extract Derived from *Euglena Gracilis* Overcomes Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation in Microglia: Role of NF- κ B and Nrf2 Signaling Pathways. *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58*, 3515–3528. [[CrossRef](#)]
17. Lee, A.-H.; Shin, H.-Y.; Park, J.-H.; Koo, S.Y.; Kim, S.M.; Yang, S.-H. Fucoxanthin from Microalgae *Phaeodactylum Tricornutum* Inhibits Pro-Inflammatory Cytokines by Regulating Both NF- κ B and NLRP3 Inflammasome Activation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zebiri, I.; Jacquette, B.; Francezon, N.; Herbaut, M.; Latigui, A.; Bricaud, S.; Tremblay, R.; Pasetto, P.; Mouget, J.-L.; Dittmer, J. The Polysaccharidic Nature of the Skeleton of Marennine as Determined by NMR Spectroscopy. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 42. [[CrossRef](#)]
19. Lankester, E.R. Green Oysters. *Nature* **1895**, *52*, 28–29. [[CrossRef](#)]
20. Falaise, C.; Cormier, P.; Tremblay, R.; Audet, C.; Deschênes, J.-S.; Turcotte, F.; François, C.; Seger, A.; Hallegraef, G.; Lindquist, N.; et al. Harmful or Harmless: Biological Effects of Marennine on Marine Organisms. *Aquat. Toxicol.* **2019**, *209*, 13–25. [[CrossRef](#)]
21. Gastineau, R.; Turcotte, F.; Pouvreau, J.-B.; Morançais, M.; Fleurence, J.; Windarto, E.; Prasetya, F.; Arsad, S.; Jaouen, P.; Babin, M.; et al. Marennine, Promising Blue Pigments from a Widespread *Haslea* Diatom Species Complex. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 3161–3189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Schubert, H.; Tremblin, G.; Robert, J.-M.; Sagert, S.; Rincé, Y. In-Vivo Fluorescence Measurement of Photosynthesis of *Haslea ostrearia* Simonsen in Relation to Marennine Content. *Diatom Res.* **1995**, *10*, 341–349. [[CrossRef](#)]
23. Pouvreau, J.-B.; Morançais, M.; Fleury, F.; Rosa, P.; Thion, L.; Cahingt, B.; Zal, F.; Fleurence, J.; Pondaven, P. Preliminary Characterisation of the Blue-Green Pigment “Marennine” from the Marine Tychopelagic Diatom *Haslea Ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 757–767. [[CrossRef](#)]
24. Pouvreau, J.-B.; Taran, F.; Rosa, P.; Pin, S.; Fleurence, J.; Pondaven, P. Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Marennine, a Blue-Green Polyphenolic Pigment from the Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen Responsible for the Natural Greening of Cultured Oysters. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6278–6286. [[CrossRef](#)]
25. Prasetya, F.S.; Safitri, I.; Widowati, I.; Cognie, B.; Decottignies, P.; Gastineau, R.; Morançais, M.; Windarto, E.; Tremblay, R.; Mouget, J.-L. Does Allelopathy Affect Co-Culturing *Haslea Ostrearia* with Other Microalgae Relevant to Aquaculture? *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 2241–2254. [[CrossRef](#)]
26. Bergé, J.-P.; Bourgougnon, N.; Alban, S.; Pojer, F.; Billaudel, S.; Chermann, J.-C.; Robert, J.M.; Franz, G. Antiviral and Anticoagulant Activities of a Water-Soluble Fraction of the Marine Diatom *Haslea Ostrearia*. *Planta Med.* **1999**, *65*, 604–609. [[CrossRef](#)]
27. Gastineau, R.; Pouvreau, J.-B.; Helliou, C.; Morançais, M.; Fleurence, J.; Gaudin, P.; Bourgougnon, N.; Mouget, J.-L. Biological Activities of Purified Marennine, the Blue Pigment Responsible for the Greening of Oysters. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 3599–3605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Carbonnelle, D.; Pondaven, P.; Morançais, M.; Masse, G.; Bosch, S.; Jacquot, C.; Briand, G.; Robert, J.; Roussakis, C. Antitumor and Antiproliferative Effects of an Aqueous Extract from the Marine Diatom *Haslea Ostrearia* (Simonsen) against Solid Tumors: Lung Carcinoma (NSCLC-N6), Kidney Carcinoma (E39) and Melanoma (M96) Cell Lines. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 621–624.
29. Habanjar, O.; Diab-Assaf, M.; Caldefie-Chezet, F.; Delort, L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12200. [[CrossRef](#)]
30. Masood, M.I.; Hauke, N.T.; Nasim, M.J.; Sarfraz, M.; Naseem, M.; Schäfer, K.H. Neural Stem Cell-Based in Vitro Bioassay for the Assessment of Neurotoxic Potential of Water Samples. *J. Environ. Sci.* **2021**, *101*, 72–86. [[CrossRef](#)]
31. Verkhatsky, A.; Zorec, R.; Parpura, V. Stratification of Astrocytes in Healthy and Diseased Brain. *Brain Pathol.* **2017**, *27*, 629–644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yin, J.; Valin, K.L.; Dixon, M.L.; Leavenworth, J.W. The Role of Microglia and Macrophages in CNS Homeostasis, Autoimmunity, and Cancer. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 5150678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bogdan, C.; Vodovotz, Y.; Nathan, C. Macrophage Deactivation by Interleukin 10. *J. Exp. Med.* **1991**, *174*, 1549–1555. [[CrossRef](#)]
34. Hamilton, T.A.; Ohmori, Y.; Tebo, J.M.; Kishore, R. Regulation of Macrophage Gene Expression by Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines. *Pathobiology* **1999**, *67*, 241–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Locksley, R.M.; Killeen, N.; Lenardo, M.J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies. *Cell* **2001**, *104*, 487–501. [[CrossRef](#)]
36. Vieira, L.Q.; Goldschmidt, M.; Nashleanas, M.; Pfeffer, K.; Mak, T.; Scott, P. Mice Lacking the TNF Receptor P55 Fail to Resolve Lesions Caused by Infection with *Leishmania Major*, but Control Parasite Replication. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 827–835. [[CrossRef](#)]
37. Marino, M.W.; Dunn, A.; Grail, D.; Inglese, M.; Noguchi, Y.; Richards, E.; Jungbluth, A.; Wada, H.; Moore, M.; Williamson, B.; et al. Characterization of Tumor Necrosis Factor-Deficient Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8093–8098. [[CrossRef](#)]
38. Welsch-Alves, J.V.; Crocker, S.J.; Milner, R. A Dual Role for Microglia in Promoting Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Expression in Glial Cells in Response to Neuroinflammatory Stimuli. *J. Neuroinflamm.* **2011**, *8*, 61. [[CrossRef](#)]
39. Hobbs, S.; Reynoso, M.; Geddis, A.V.; Mitrophanov, A.Y.; Matheny, R.W. LPS-stimulated NF- κ B P65 Dynamic Response Marks the Initiation of TNF Expression and Transition to IL-10 Expression in RAW 264.7 Macrophages. *Physiol. Rep.* **2018**, *6*, e13914. [[CrossRef](#)]
40. Rhee, S.H. Lipopolysaccharide: Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut. *Intest. Res.* **2014**, *12*, 90. [[CrossRef](#)]
41. Lobo-Silva, D.; Carriche, G.M.; Castro, A.G.; Roque, S.; Saraiva, M. Balancing the Immune Response in the Brain: IL-10 and Its Regulation. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 297. [[CrossRef](#)]
42. Kessler, B.; Rinchai, D.; Kewcharoenwong, C.; Nithichanon, A.; Biggart, R.; Hawrylowicz, C.M.; Bancroft, G.J.; Lertmemongkolchai, G. Interleukin 10 Inhibits Pro-Inflammatory Cytokine Responses and Killing of *Burkholderia Pseudomallei*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42791. [[CrossRef](#)]
43. dos Santos, S.E.; Medeiros, M.; Porfirio, J.; Tavares, W.; Pessôa, L.; Grinberg, L.; Leite, R.E.P.; Ferretti-Rebustini, R.E.L.; Suemoto, C.K.; Filho, W.J.; et al. Similar Microglial Cell Densities across Brain Structures and Mammalian Species: Implications for Brain Tissue Function. *J. Neurosci.* **2020**, *40*, 4622–4643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Thornberry, N.A.; Bull, H.G.; Calaycay, J.R.; Chapman, K.T.; Howard, A.D.; Kostura, M.J.; Miller, D.K.; Molineaux, S.M.; Weidner, J.R.; Aunins, J.; et al. A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1 β processing in Monocytes. *Nature* **1992**, *356*, 768–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Liu, L.; Liu, J.; Bao, J.; Bai, Q.; Wang, G. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1024. [[CrossRef](#)]
46. Norden, D.M.; Trojanowski, P.J.; Walker, F.R.; Godbout, J.P. Insensitivity of Astrocytes to Interleukin 10 Signaling Following Peripheral Immune Challenge Results in Prolonged Microglial Activation in the Aged Brain. *Neurobiol. Aging* **2016**, *44*, 22–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Shemer, A.; Scheyltjens, I.; Frumer, G.R.; Kim, J.-S.; Grozovski, J.; Ayanaw, S.; Dassa, B.; van Hove, H.; Chappell-Maor, L.; Boura-Halfon, S.; et al. Interleukin-10 Prevents Pathological Microglia Hyperactivation Following Peripheral Endotoxin Challenge. *Immunity* **2020**, *53*, 1033–1049.e7. [[CrossRef](#)]
48. Qadri, M.; Jay, G.D.; Zhang, L.X.; Schmidt, T.A.; Totonchy, J.; Elsaid, K.A. Proteoglycan-4 Is an Essential Regulator of Synovial Macrophage Polarization and Inflammatory Macrophage Joint Infiltration. *Arthritis Res. Ther.* **2021**, *23*, 241. [[CrossRef](#)]
49. Méresse, S.; Larrigaldie, V.; Oummadi, A.; de Concini, V.; Morisset-Lopez, S.; Reverchon, F.; Menuet, A.; Montécot-Dubourg, C.; Mortaud, S. β -N-Methyl-Amino-L-Alanine Cyanotoxin Promotes Modification of Undifferentiated Cells Population and Disrupts the Inflammatory Status in Primary Cultures of Neural Stem Cells. *Toxicology* **2022**, *482*, 153358. [[CrossRef](#)]
50. Peng, B.; Xiao, J.; Wang, K.; So, K.-F.; Tipoe, G.L.; Lin, B. Suppression of Microglial Activation Is Neuroprotective in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 8139–8150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Kim, M.-O.; Suh, H.-S.; Si, Q.; Terman, B.I.; Lee, S.C. Anti-CD45RO Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Microglia: Role of Hck Tyrosine Kinase and Implications for AIDS Dementia. *J. Virol.* **2006**, *80*, 62–72. [[CrossRef](#)]
52. Tan, J.; Town, T.; Mullan, M. CD45 Inhibits CD40L-Induced Microglial Activation via Negative Regulation of the Src/P44/42 MAPK Pathway. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 37224–37231. [[CrossRef](#)]
53. Tan, J.; Town, T.; Mori, T.; Wu, Y.; Saxe, M.; Crawford, F.; Mullan, M. CD45 Opposes β -Amyloid Peptide-Induced Microglial Activation via Inhibition of P44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 7587–7594. [[CrossRef](#)]

54. Tepavčević, V.; Lazarini, F.; Alfaro-Cervello, C.; Kerninon, C.; Yoshikawa, K.; Garcia-Verdugo, J.M.; Lledo, P.-M.; Nait-Oumesmar, B.; Baron-Van Evercooren, A. Inflammation-Induced Subventricular Zone Dysfunction Leads to Olfactory Deficits in a Targeted Mouse Model of Multiple Sclerosis. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4722–4734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Fritze, J.; Ginisty, A.; McDonald, R.; Quist, E.; Stamp, E.; Monni, E.; Dhapola, P.; Lang, S.; Ahlenius, H. Loss of Cxcr5 Alters Neuroblast Proliferation and Migration in the Aged Brain. *Stem Cells* **2020**, *38*, 1175–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pantelis, C.; Jayaram, M.; Hannan, A.J.; Wesselingh, R.; Nithianantharajah, J.; Wannan, C.M.; Syeda, W.T.; Choy, K.C.; Zantomio, D.; Christopoulos, A.; et al. Neurological, Neuropsychiatric and Neurodevelopmental Complications of COVID-19. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **2021**, *55*, 750–762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Herzine, A.; Laugeray, A.; Feat, J.; Menuet, A.; Quesniaux, V.; Richard, O.; Pichon, J.; Montécot-Dubourg, C.; Perche, O.; Mortaud, S. Perinatal Exposure to Glufosinate Ammonium Herbicide Impairs Neurogenesis and Neuroblast Migration through Cytoskeleton Destabilization. *Front. Cell Neurosci.* **2016**, *10*, 191. [[CrossRef](#)]
58. Urra, F.; Araya-Maturana, R. Targeting Metastasis with Snake Toxins: Molecular Mechanisms. *Toxins* **2017**, *9*, 390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Liu, F.; Huang, J.; Liu, Z. Vincristine Impairs Microtubules and Causes Neurotoxicity in Cerebral Organoids. *Neuroscience* **2019**, *404*, 530–540. [[CrossRef](#)]
60. Francezon, N.; Herbaut, M.; Bardeau, J.-F.; Cougnon, C.; Bélanger, W.; Tremblay, R.; Jacquette, B.; Dittmer, J.; Pouvreau, J.-B.; Mouget, J.-L.; et al. Electrochromic Properties and Electrochemical Behavior of Marennine, a Bioactive Blue-Green Pigment Produced by the Marine Diatom *Haslea Ostrearia*. *Mar. Drugs* **2021**, *19*, 231. [[CrossRef](#)]
61. Mouget, J.-L.; Gastineau, R.; Davidovich, O.; Gaudin, P.; Davidovich, N.A. Light Is a Key Factor in Triggering Sexual Reproduction in the Pennate Diatom *Haslea Ostrearia*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *69*, 194–201. [[CrossRef](#)]
62. Schildege, S.; Bohrer, C.; Beck, K.; Schachtrup, C. Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. *J. Vis. Exp.* **2013**, e50079. [[CrossRef](#)]
63. Peng, H.; Geil Nickell, C.R.; Chen, K.Y.; McClain, J.A.; Nixon, K. Increased Expression of M1 and M2 Phenotypic Markers in Isolated Microglia after Four-Day Binge Alcohol Exposure in Male Rats. *Alcohol* **2017**, *62*, 29–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Delgehyr, N.; Meunier, A.; Faucourt, M.; Bosch Grau, M.; Strehl, L.; Janke, C.; Spassky, N. Ependymal Cell Differentiation, from Monociliated to Multiciliated Cells. *Methods Cell Biol.* **2015**, *127*, 19–35.
65. Feat-Vetel, J.; Larrigaldie, V.; Meyer-Dilhet, G.; Herzine, A.; Mougou, C.; Laugeray, A.; Gefflaut, T.; Richard, O.; Quesniaux, V.; Montécot-Dubourg, C.; et al. Multiple Effects of the Herbicide Glufosinate-Ammonium and Its Main Metabolite on Neural Stem Cells from the Subventricular Zone of Newborn Mice. *Neurotoxicology* **2018**, *69*, 152–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Bresciani, G.; Hofland, L.J.; Dogan, F.; Giamas, G.; Gagliano, T.; Zatelli, M.C. Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Baumann, J.; Barenys, M.; Gassmann, K.; Fritsche, E. Comparative Human and Rat “Neurosphere Assay” for Developmental Neurotoxicity Testing. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2014**, *59*, 12–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [[CrossRef](#)]
69. Bouhrel, Z.; Arnold, A.A.; Deschênes, J.-S.; Mouget, J.-L.; Warschawski, D.E.; Tremblay, R.; Marcotte, I. Investigating the Action of the Microalgal Pigment Marennine on *Vibrio Splendidus* by in Vivo 2H and 31P Solid-State NMR. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembr.* **2021**, *1863*, 183642. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Sarah MÉRESSE

Etude *in vitro* des effets neurotoxiques et neuro-inflammatoires de trois toxiques environnementaux analogues d'acides-aminés sur des modèles de culture de cellules souches neurales

Les polluants environnementaux, comme le glyphosate (GLY) et le glufosinate d'ammonium (GLA) sont des herbicides qui participent à l'eutrophisation des milieux. Cela conduit, en association avec le changement climatique, à des efflorescences cyanobactériennes. La β -méthylamino-L-alanine (BMAA) est une cyanotoxine neurotoxique. Nos travaux antérieurs ont démontré que BMAA peut perturber l'homéostasie du système nerveux central en ciblant les cellules gliales. Nous avons mis en évidence que BMAA altère les cellules souches neurales issues de la SVZ et conduit les astrocytes et les cellules microgliales dans un état pro-inflammatoire. Une exposition précoce à des contaminants environnementaux peut altérer durablement le développement du cerveau via la neuro-inflammation et ainsi conférer des prédispositions à développer diverses pathologies neuropsychiatriques et/ou neurodégénératives. Notre but a été de se rapprocher des conditions réelles d'exposition. Ce sujet de thèse a cherché à déterminer la capacité d'une exposition à un cocktail (GLY, GLA, BMAA) à induire des effets neurotoxiques et/ou neuro-inflammatoires, à l'aide de modèles *in vitro* de cellules souches neurales en 2D ou en organoïdes. Ces modèles fournissent une alternative pour étudier les effets néfastes des contaminants environnementaux sur les processus neurodéveloppementaux critiques, y compris la prolifération et la différenciation cellulaire. Mes résultats ont montré que les cellules gliales étaient affectées par la combinaison de trois toxiques environnementaux. Les expositions ont montré une prolifération des cellules microgliales suite à une exposition au GLA mais plus encore par le cocktail de toxique. Cependant, le cocktail n'a pas affecté l'état inflammatoire des astrocytes et des cellules microgliales alors que le glufosinate d'ammonium et le BMAA l'ont fait. Ces résultats suggèrent l'existence d'interactions entre ces composés, sans effet synergique, qui pourraient trouver leur origine dans leur analogie structurale avec les acides aminés et donc avoir des cibles moléculaires communes. Cette thèse démontre la nécessité de considérer l'exposome en toxicologie pour modéliser au mieux les réalités.

Mots clés : BMAA, herbicides, cocktail, neuro-inflammation, neurogenèse, exposome, one-health

In vitro study of the neurotoxic and neuroinflammatory effects of three environmental toxicants analogs of amino acids on neural stem cell culture models

Environmental pollutants, such as glyphosate (GLY) and glufosinate ammonium (GLA), are herbicides that contribute to the eutrophication of environments. This leads, in association with climate change, to cyanobacterial blooms. β -methylamino-L-alanine (BMAA) is a neurotoxic cyanotoxin. Our previous work demonstrated that BMAA can disrupt central nervous system homeostasis by targeting glial cells. We have shown that BMAA alters SVZ-derived neural stem cells and drives astrocytes and microglial cells into a pro-inflammatory state. Early exposure to environmental contaminants can permanently alter brain development via neuroinflammation and thus confer predisposition to develop various neuropsychiatric and/or neurodegenerative pathologies. Our goal was to get closer to the real conditions of exposure. This thesis sought to determine the capacity of a cocktail exposure (GLY, GLA, BMAA) to induce neurotoxic and/or neuroinflammatory effects, using *in vitro* models of neural stem cells in 2D or organoids. These models provide an alternative to study the adverse effects of environmental contaminants on critical neurodevelopmental processes, including cell proliferation and differentiation. My results showed that glial cells were affected by the combination of three environmental toxicants. The exposures showed microglial cell proliferation following GLA exposure but more so by the toxicant cocktail. However, the cocktail did not affect the inflammatory state of astrocytes and microglial cells whereas ammonium glufosinate and BMAA did. These results suggest the existence of interactions between these compounds, without a synergistic effect, which may originate from their structural analogy with amino acids and thus have common molecular targets. This thesis demonstrates the need to consider the exposome in toxicology in order to best model realities.

Keywords : BMAA, herbicides, cocktail, neuroinflammation, neurogenesis, exposome, one-health



Immunologie et Neurogénétique
Expérimentale et Moléculaire (INEM)
UMR 7355 – CNRS

