



**Etude des effets de la co-exposition aux pesticides en
supplémentation à un prébiotique sur le microbiote
intestinal et sur la barrière hémato-encéphalique chez
des populations sensibles : combinaison de modèles in
vivo et in vitro**

Maria Abou Diwan

► **To cite this version:**

Maria Abou Diwan. Etude des effets de la co-exposition aux pesticides en supplémentation à un prébiotique sur le microbiote intestinal et sur la barrière hémato-encéphalique chez des populations sensibles : combinaison de modèles in vivo et in vitro. Microbiologie et Parasitologie. Université de Picardie Jules Verne, 2024. Français. NNT : 2024AMIE0028 . tel-05410992

HAL Id: tel-05410992

<https://theses.hal.science/tel-05410992v1>

Submitted on 11 Dec 2025

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.



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Microbiologie et Physiologie*

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Maria ABOU DIWAN

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Etude des effets de la co-exposition aux pesticides en
supplémentation à un prébiotique sur le microbiote intestinal et sur
la barrière hémato-encéphalique chez des populations sensibles :
combinaison de modèles in vivo et in vitro*

Soutenue le 16 décembre 2024, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Philippe Langella, Directeur de recherche,

UMR 1319 Micalis, INRA, Jouy en Josas

M^{me} Anne-Judith Waligora-Dupriet, Professeur des Universités,

INSERM UMR-S 1139, Paris Cité, Paris

M^{me} Muriel Mercier-Bonin, Directrice de recherche,

UMR 1331 TOXALIM, INRAE, Toulouse

M. Sylvain Billet, Maître de Conférences HDR,

UCEIV UR4492, Université du Littoral-Côte d'Opale

M^{me} Hafida Khorsi-Cauet, Professeur des Universités,

PériTox UMR_I 01 UPJV/INERIS, Université Picardie Jules Verne

M^{me} Pietra Candela, Maître de Conférences

LBHE UR 2465, Université d'Artois

Président du jury

Rapporteuse

Rapporteuse

Examineur

Directrice de thèse

Co-Directrice de thèse





Thèse de Doctorat

*Mention Biologie Santé
Spécialité Microbiologie et Physiologie*

présentée à l'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Maria ABOU DIWAN

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Etude des effets de la co-exposition aux pesticides en
supplémentation à un prébiotique sur le microbiote intestinal et sur
la barrière hémato-encéphalique chez des populations sensibles :
combinaison de modèles in vivo et in vitro*

Soutenue le 16 décembre 2024, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. Philippe Langella, Directeur de recherche,

UMR 1319 Micalis, INRA, Jouy en Josas

M^{me} Anne-Judith Waligora-Dupriet, Professeur des Universités,

INSERM UMR-S 1139, Paris Cité, Paris

M^{me} Muriel Mercier-Bonin, Directrice de recherche,

UMR 1331 TOXALIM, INRAE, Toulouse

M. Sylvain Billet, Maître de Conférences HDR,

UCEIV UR4492, Université du Littoral-Côte d'Opale

M^{me} Hafida Khorsi-Cauet, Professeur des Universités,

PériTox UMR_I 01 UPJV/INERIS, Université Picardie Jules Verne

M^{me} Pietra Candela, Maître de Conférences

LBHE UR 2465, Université d'Artois

Président du jury

Rapporteuse

Rapporteuse

Examineur

Directrice de thèse

Co-Directrice de thèse



*« Pour surmonter les obstacles, il faut faire de chaque échec un tremplin,
savoir en tirer une leçon et avancer plus loin »*

Anthony Robbins

A mes parents Grèce et Georges

A ma sœur et mon frère, Racha et Joseph

A toute ma famille

A l'amour de ma vie Sophian

A mon Liban

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je remercie, tout d'abord, chaleureusement les membres de mon jury, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

A **Madame Anne-Judith Waligora-Dupriet**, merci d'avoir accepté d'être rapporteuse. J'étais très heureuse de vous rencontrer au congrès de la SFSE à Valence en 2022. J'ai beaucoup apprécié nos échanges ce jour-là. Votre encouragement et positivité m'ont beaucoup marquée.

À **Madame Muriel Mercier-Bonin**, merci d'avoir accepté d'être rapporteuse. Bien que nous ne nous connaissions pas personnellement, j'ai entendu beaucoup de choses positives à votre sujet. Je suis très curieuse de découvrir vos remarques et votre expertise sur mon travail.

À **Monsieur Philippe Langella**, je suis honorée que vous ayez accepté d'être examinateur de ma thèse. Après avoir lu vos travaux de recherche, je serai ravie d'échanger avec vous sur le microbiote intestinal.

À **Monsieur Sylvain Billet**, je suis très heureuse que vous soyez examinateur de ma thèse. C'était un plaisir d'échanger avec vous à plusieurs reprises, au congrès de l'ARET-SFTG-STCM à Paris en 2023 et puis au LBHE. Pendant ces échanges, par vos questions, vous avez montré un grand intérêt pour mon projet, cela m'a motivée et je vous en remercie.

Aux directeurs des laboratoires LBHE et PériTox :

Je remercie **monsieur Fabien Gosselet**, directeur du Laboratoire de la barrière hémato-encéphalique, de m'avoir accueillie dans son équipe. Fabien, je te remercie de la confiance que tu m'as accordée avant même d'arriver en France pour réaliser mon stage au LBHE. Je suis très reconnaissante de m'avoir facilité avec Piera mon installation à Lens ainsi que mes déplacements entre les deux laboratoires. Merci pour tes conseils et encouragements pendant mon stage de master 2 et puis les trois années de thèse. Je te remercie aussi pour tes suggestions et tes corrections de ma revue et mes articles, qui m'ont permis de les améliorer.

Je remercie également **madame Véronique Bach**, directrice du laboratoire PériTox, de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci Véronique pour ton soutien, ta disponibilité et surtout merci pour ton écoute. Tes conseils m'ont permis de voir certaines choses différemment afin de mieux avancer dans mon travail. Merci à l'attention que tu as portée à ma santé physique et mentale durant cette thèse et d'avoir veillé à ce que je prenne soin de ma santé.

À mes directrices de thèse :

Piera, je te remercie sincèrement d'avoir été toujours à mes côtés dès nos premiers échanges avant même le début de mon stage. Tes échanges pendant que j'étais au Liban m'ont rassurée parce que j'ai su que j'arriverai en France entre de bonnes mains. Depuis le début, ta gentillesse m'a marquée, tu t'es démenée à me trouver un logement et à me diriger vers les bonnes personnes pour bénéficier des aides étudiantes. Tu as rendu plus simple cette phase difficile de ma vie et je t'en suis reconnaissante. Tu m'as guidée, tu m'as formée, tu as fait en sorte que je sois à l'aise au sein de l'équipe et que j'aie de bonnes relations avec les membres du laboratoire. Merci pour le temps que tu as accordé pour qu'on discute de Sciences, cela m'a permis d'aiguiser mon esprit scientifique. Grand merci de m'avoir encouragée et épaulée afin que je réussisse mon concours régional de thèse. Pendant ces trois années, j'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi. A tes côtés, j'ai pu améliorer mon esprit scientifique et évoluer en tant que chercheuse. Non seulement tu as été à mes côtés pendant mon passage du master au doctorat mais aussi lors du passage du doctorat à l'ATER. Ça sera toujours un plaisir de continuer ce travail avec toi pendant mon ATER. Piera, si je devais te remercier pour toute ton aide et tout ce que tu as fait pendant toutes ces années, l'espace dédié aux remerciements ne suffirait pas, merci encore.

Hafida, je me souviens du premier jour où je t'ai rencontré au laboratoire PériTox pendant mon stage de master 2 quand je suis venue avec Piera. J'ai beaucoup apprécié ton accueil chaleureux, ta bonne humeur et ta gentillesse. Ce jour-là, je t'ai posé pleins de questions sur le sujet et en lien avec la microbiologie. Merci parce que tu as été à l'écoute, d'avoir pris le temps de m'expliquer les détails du projet et de m'avoir réservé une place dans tes travaux de recherche. Merci de m'avoir accompagnée avec Piera dans ma préparation au concours de la thèse. Pendant ces trois années de thèse, je te remercie de m'avoir guidée et poussée à valoriser mon travail à plusieurs échelles : communications orales et posters dans des congrès, d'écrire une revue et plusieurs articles ainsi que collaborer avec d'autres collègues doctorants dans la publication de revues. Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire des missions d'enseignement, cela m'a beaucoup aidé à m'intégrer dans l'académique. Je tiens aussi à te remercier de m'avoir permis d'encadrer avec toi des stagiaires, merci pour la confiance que tu m'as accordée. Je te remercie aussi des moments joyeux que nous avons partagés en découvrant une nouvelle ville lors d'un déplacement pour un congrès. Merci aussi pour tous les moments que tu as accordés aux discussions qui nous ont permis de mieux se connaître et de renforcer notre relation personnelle et professionnelle.

Hafida et Piera, merci pour votre soutien indéfectible, votre confiance en moi, vos conseils avisés et votre encouragement tout au long de ce parcours. Votre expertise, patience et encadrement ont été essentiels à la réussite de ce projet.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers de nombreuses personnes ayant participé dans ce projet, à l'échelle technique, pédagogique, leur soutien ou tout simplement par leur présence à mes côtés. Cette thèse ayant été la suite de mon projet de master 2 qui a eu lieu au sein du LBHE, je tiens à remercier tout d'abord les membres de cette équipe :

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe **LBHE** qui se sont intéressés à ce projet et avec qui j'ai passé d'agréables moments :

Je remercie chaleureusement la gestionnaire administrative du LBHE **madame Nathalie Nawrot**. Je te remercie Nathalie pour ton accueil chaleureux, ton sourire et ta gentillesse. Je garderai nos précieuses discussions sur le Liban dans mon cœur.

Je tiens à remercier **madame Marie-Christine Boucau** de m'avoir formée aux techniques de biologie moléculaire au sein du LBHE et pour son investissement dans les extractions des microvaisseaux cérébraux des rats. Marie-Christine, merci pour la bonne humeur que tu as ajoutée et ton soutien lors de nos longues manips au laboratoire. Je te remercie de ton encouragement quand tu me disais « petit mais costaud », cela me motivait à continuer et à avancer dans mon travail. Merci aussi pour le travail que tu as assuré pendant que je travaillais au laboratoire PériTox.

Je remercie également **madame Lucie Dehouck** de m'avoir formée aux techniques de culture cellulaire, d'immunofluorescence et de transport. Merci Lucie pour tout le temps que tu as accordé à ce projet dans les extractions des microvaisseaux cérébraux des rats et ton investissement dans la culture des cellules qui étaient dédiées à ce projet.

Je remercie **monsieur Emmanuel Sevin**, de m'avoir accompagnée dans les techniques de translocation et de perméabilité pendant la thèse. Merci Manu pour ton soutien, ton aide et ton écoute. Merci de m'avoir facilité le travail quand j'arrivais le matin après mon trajet d'Amiens vers Lens. Je tiens à te remercier sincèrement d'avoir géré avec Juliette et tous les doctorants et membres de l'équipe, les cultures de cellules. Merci pour ton expertise dans l'analyse des résultats et les tests statistiques. Ton aide a facilité la réalisation de ce travail, merci encore.

Je remercie **madame Caroline Mysiorek** et **madame Marie-Pierre Dehouk**. Merci Caroline et Marie-Pierre pour votre soutien et vos précieux conseils pendant mes présentations dans les réunions de laboratoire. Je remercie aussi **monsieur Julien Saint-Pol** pour son aide et sympathie.

Je remercie également **monsieur Maxime Culot**, responsable du master de toxicologie MENACE et devenu directeur adjoint du LBHE. Merci Maxime pour les conseils et questions pertinentes pendant les réunions de laboratoire. Merci aussi pour les propositions de stagiaires de master 2.

Je remercie également **madame Sophie Duban**. Merci Sophie pour toutes les fois où tu as pris des nouvelles de ma famille au Liban quand la situation allait mal.

Je tiens également à remercier vivement mes collègues doctorants et post-doctorants pour les moments conviviaux que nous avons passés ensemble. Je remercie plus particulièrement :

Grand merci à **Shiraz Dib** pour son soutien, les moments de joie et de fête. Merci Shiraz de m'avoir accueillie chez toi comme une sœur, merci de m'avoir préparé ma fête d'anniversaire et d'avoir célébrer mon acceptation en thèse. Merci parce que tu as ramené le Liban en France quand je t'ai dit que les repas de ma mère me manquent. Merci encore pour tous ces moments précieux.

Mes remerciements vont aussi à **Rodrigo Azevedo Loiola**. Merci Rodrigo pour tous tes conseils techniques dans ce projet. Merci aussi aux moments conviviaux que nous avons partagés avec ta famille.

Merci à **Joelle Jreis**, ma collègue doctorante du laboratoire de mathématiques à l'Université d'Artois. Je te remercie Joelle pour ta gentillesse, ton soutien, ton écoute et ta sincère amitié. J'ai apprécié ta présence à mes côtés et ta préoccupation, merci pour toutes tes visites. Grâce à toi, je ne me suis point sentie seule à Lens. Merci aussi à **Saad Saba** pour son soutien et sa gentillesse pendant son ATER au LBHE.

Merci à **Diksha Mukhija**, **Eleonora Rizzi** et encore une fois **Shiraz**, **Joelle** et **Saad** pour les belles soirées que nous avons partagées.

Je n'oublie pas aussi tous les doctorants et post-doctorants qui sont arrivés un peu avant ou bien après mon départ vers PériTox. Je vous remercie Marine, Cindy, Océane, Margot et Pierre pour toute votre aide dans la culture des cellules quand j'étais à Amiens, je vous en suis très reconnaissante. Je tiens aussi à remercier plus particulièrement, **Juliette Poiriez**. Merci Juliette de l'intérêt que tu as porté à ce projet depuis notre rencontre au congrès de Paris. Merci pour tout le travail que tu as fait pour ce projet, je t'en suis très reconnaissante. Je suis heureuse de travailler avec toi et continuer cette collaboration ensemble. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse et c'est avec sérénité que je te confie la suite de ce projet.

Après mon départ de Lens pour m'installer à Amiens, ma thèse s'est principalement déroulée au sein du laboratoire PériTox :

Je tiens tout d'abord à remercier **madame Karen Chardon**, directrice adjointe du laboratoire PériTox. Un grand merci Karen pour ton écoute, ton intérêt et ton soutien.

Je remercie **monsieur Frédéric Telliez**, qui était directeur de l'Institut d'Ingénierie de la Santé (2IS) pendant mon monitorat. Je te remercie Frédéric pour ton accueil et nos échanges au sein de l'institut et pour la confiance que tu m'as accordée pendant mes enseignements.

Je remercie aussi **monsieur Erwan Stéphan-Blanchard**, qui est le directeur actuel de 2IS. Je te remercie Erwan pour ton aide précieuse dans ma mission d'enseignement. Merci pour ton partage d'expérience, les moments d'échange avec les doctorants et ta bonne humeur.

Je remercie **monsieur Maurice Biendo**, ancien chef du laboratoire de bactériologie au CHU d'Amiens. Merci M. Biendo pour nos échanges scientifiques et ton aide dans l'encadrement de : Aya et Gabriel. J'ai beaucoup apprécié l'évolution de notre relation professionnelle au cours de ces années. J'ai apprécié l'attention que vous avez portée à mon projet et votre bienveillance à mon égard. J'ai bien aimé les moments quand vous êtes venu avec vos petits-enfants, j'ai découvert et apprécié votre côté attentionné.

Je tiens à remercier la gestionnaire administrative du laboratoire PériTox, **madame Emmanuelle Boyeldieu**. Merci Manue pour ton accueil, ton soutien et toutes les démarches administratives que tu as faites pour ce projet, merci énormément d'avoir veillé à ce que toutes les commandes soient réalisées ainsi que mes déplacements entre Amiens et Lens et aux congrès.

Je remercie vivement **monsieur Stéphane Delanaud**. Merci Stéphane pour ta bienveillance, ta gentillesse et d'avoir été autant présent pour les doctorants, merci d'avoir été à nos côtés. J'admire ton énergie positive qui te pousse toujours à nous aider et trouver des solutions à tous nos problèmes techniques. J'ai beaucoup apprécié de travailler sur le modèle intestinal avec toi, merci aussi pour ton aide précieuse dans l'analyse des données du SHIME. Merci de m'avoir aidée quand je travaillais seule sur le modèle lorsque je n'avais pas de stagiaires pour m'aider.

Je remercie également **madame Aurélie Corona** pour son aide dans ce projet. Merci Aurélie d'avoir gérer les commandes avec Manue. Je te remercie pour ton rire et tous les efforts que tu as faits afin de m'aider dans le modèle intestinal mais aussi la chambre anaérobie ☺ en chantant ensemble pour rendre le travail agréable. Merci d'avoir encadré des stagiaires BTS et géré avec eux les analyses des boîtes de culture mais aussi des échantillons du SHIME quand j'étais dans un congrès, ou à Lens ou pendant que je rédigeais mon manuscrit de thèse, merci beaucoup.

Merci à **monsieur Pierre Tourneux** et **madame Estelle Durand**. Merci Pierre pour ta gentillesse et les échanges autour des viennoiseries matinales que tu raménais. Merci Estelle pour m'avoir fait découvert la médiation et la vulgarisation scientifique. J'ai apprécié ton partage d'expérience des fêtes de la science et merci aussi pour ta bonne humeur.

Un grand merci à tous les stagiaires qui ont mis toute leur énergie dans ce projet et sans qui celui-ci n'aurait jamais pu être réalisé. Plus particulièrement, merci **Julien Lucas** pour ton intérêt et ton implication immédiats dans ce projet. J'ai apprécié encadrer une personne aussi déterminée comme toi Julien. J'ai adoré ta rédaction, les mots bien choisis, ton enthousiasme et ta passion pour le microbiote intestinal que tu as décrit « les habitants de l'intestin ». Merci pour tous les moments partagés autour d'un thé avec Sophian. Merci aussi à **Emma Bellet** d'avoir pris en main le travail sur le modèle intestinal avec Julien et merci pour ton travail de qualité. J'ai apprécié votre complémentarité et travail d'équipe, vous m'aviez beaucoup aidé, je vous en remercie. Je remercie également Aya **El Gharbi**, j'admire ta dédication dans ton travail envers ton projet professionnel et ta détermination pour atteindre tes objectifs. Merci parce que tu as donné toute ton énergie à ce projet même quand tu avais des cours en parallèle et ton travail étudiant le soir. Je remercie aussi **Gabriel Prevost** pour les efforts qu'il a faits pendant ce stage en s'occupant tout seul du maintien quotidien du modèle SHIME et pour avoir assuré les ensemencements avec moi et puis le comptage de colonies des boîtes interminables. Je suis très fière de toi Gabriel. Je remercie aussi les stagiaires BTS qui ont participé au travail du SHIME, merci à Elisa, Maëva, Emmanuelle et Ziad. Enfin, je vous remercie tous pour le travail dur que vous avez fait.

J'atteins la cinquième page de remerciement en pensant à mes collègues et amis doctorants au sein du laboratoire PériTox mais aussi les doctorants de l'INERIS qui sont également rattachés à l'équipe PériTox. Tout d'abord, je remercie particulièrement **Jennifer Maalouf**, **Layla Jamal**, **Marwa Lahimer**, **Chandreshwar Seeworuttun** connu sous le prénom **Kévin**, **Avénie Huet**, **Zeina Halbouty** et **Tuka Debora** pour les moments précieux qu'on a vécu ensemble tous les jours pour certains et moins

souvent pour d'autres. Merci pour les belles soirées que nous avons passées autour d'un diner, d'un jeu ou d'un verre. Merci aussi à **Lisa Michelant** et **Raphaël Bodin** avec qui j'ai passé des moments d'organisation entre doctorants au sein de l'association DocA2U, j'ai beaucoup apprécié le travail avec vous mais aussi nos moments conviviaux.

Je remercie **Narimane Djekkoun** de m'avoir guidée et de m'avoir confiée son travail afin que je puisse poursuivre ce projet sur lequel elle a travaillé avant mon arrivée. Je te remercie aussi Narimane pour ton aide dans la rédaction de mon premier article scientifique. Merci parce que tu t'es rendue disponible en visio, par mail et aussi par appel téléphonique. Merci pour tous tes conseils et d'avoir été à l'écoute même quand tu devais t'occuper de ton fils et tu passais par des moments difficiles. Bravo pour ton courage et ta patience.

A **Kévin**, que j'appelle « monsieur Seeworuttun » quand j'ai envie de l'embêter, grand merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta sincère amitié. Merci beaucoup de ta présence quand il fallait célébrer une réussite, un objectif atteint, la présence d'un membre de la famille, l'achat de ma voiture qui nous a facilité beaucoup de choses (même si tu n'as jamais été à l'heure, *moi non plus parfois*) et nous a permis de profiter de très belles musiques et découvrir des villes mais merci surtout pour ta présence dans les moments rudes. Cette thèse nous a infligé des moments très difficiles, de fatigue, de faiblesse et de doute. Mais tu sais quoi ? ce n'était que du bien, car ces moments difficiles ont fait naître cette amitié sincère. Nos longues discussions sincères et honnêtes de ces moments difficiles nous ont appris à mieux les comprendre et savoir comment les surpasser. J'ai beaucoup apprécié ta présence Kiki à mes côtés, tu es plus qu'un ami mais plutôt un frère. Ta présence m'a soulagée quand j'avais besoin d'une personne de confiance à qui parler, merci pour ton écoute, merci pour ton soutien et merci beaucoup pour tous tes conseils. Sache que tu es l'exemple de l'ami fidèle et honnête, celui qui te permet d'être toi-même et d'accepter et apprécier d'être.

Merci à **Jennifer** et son mari **Charbel** pour les moments joyeux que nous avons passés ensemble, à Amiens, au Fort-Mahon, au Touquet, à Saint-Valéry sur Somme, à Lille mais aussi durant notre voyage en Grèce. Merci pour ces belles rencontres.

Merci très chère **Marwa** pour ta gentillesse et ton authenticité, je suis heureuse d'avoir une amie comme toi. J'ai beaucoup apprécié les moments que nous avons passés ensemble au laboratoire, dans un congrès qu'on a fait à deux avec Hafida, et lors de sorties entre amies. J'ai aussi apprécié de travailler avec toi dans la rédaction de ta revue et la mienne et merci d'avoir été là pour fêter nos réussites.

Je remercie aussi **Avénie** avec qui j'ai travaillé le modèle intestinal. Merci Avénie pour ton implication et d'avoir pris bien soin du modèle intestinal et de m'avoir aidée dans les ensemencements. Merci beaucoup pour ton travail minutieux, ta gentillesse et ta douceur.

J'adresse aussi un remerciement à toutes les personnes avec qui j'ai collaboré durant cette thèse :

Je pense ici à **monsieur Moncef Benkhalifa** que je remercie de m'avoir donné l'opportunité avec Hafida, de travailler avec Marwa et Sophian sur le lien entre les perturbateurs endocriniens et l'infertilité et d'écrire ensemble deux revues bibliographiques. Merci professeur Benkhalifa de m'avoir accueillie au sein de ton bureau au Centre de biologie humaine (CBH) et d'avoir discuté ensemble de Sciences mais aussi de ton séjour au Liban. Merci d'avoir partagé avec moi à la fois ton expertise et ton expérience au Liban.

Je remercie toute l'équipe de gynécologie du CHU d'Amiens, en particulier **monsieur Arthur Foulon**, chef du service de gynécologie, d'avoir identifié des participantes appropriées au projet. Je remercie **toutes les femmes volontaires enceintes et non enceintes** qui ont participé dans cette étude.

Je remercie chaleureusement **Joséphine Guilbert**, sage-femme au CHU d'Amiens. Merci Joséphine de m'avoir beaucoup aidée dans le recrutement de femmes pour participer dans cette étude. Je te remercie pour tout le temps que tu as mis et ton déplacement. Merci pour l'intérêt que tu as porté à ce projet, merci pour ta bonté et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier **madame Margot Burident**, directrice adjointe de la recherche au sein de l'UPJV, de m'avoir aidée dans le dossier du CERNI pour l'autorisation de la réalisation de l'étude in vitro.

Je remercie **madame Halima Ouadid-Ahidouch** pour nos échanges scientifiques, de nous avoir accueillies au sein de son équipe du laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire (LPCM) et d'avoir facilité avec Hafida mon travail avec Avénie sur le modèle intestinal.

J'adresse également un remerciement particulier à **madame Flore Depeint** et **monsieur Larbi Rhazi** de l'institut polytechnique d'UniLaSalle Beauvais. Je remercie monsieur Rhazi pour le dosage des métabolites bactériens. Flore, c'était un plaisir d'échanger avec toi et avoir ton regard scientifique sur l'analyse des résultats des métabolites.

Je remercie aussi l'équipe IMITOX (International Medical Institute of Toxicology and Pharmacology), plus particulièrement **monsieur Nouredine Sadeg**, **monsieur Florent Brousse** et **monsieur Gilles Malonga**. Merci d'avoir récupéré nos échantillons et doser les pesticides, merci pour tous nos échanges scientifiques. Merci beaucoup de m'avoir aidée et vérifié ma rédaction de l'analyse des résultats de dosage.

Je remercie ma collègue **Rania El Akoum** avec qui j'ai donné les TP de microbiologie à 2IS. Merci de m'avoir transmis tes compétences. Merci d'avoir partagé avec moi des moments de ta vie et ton amour pour tes enfants. Merci de m'avoir mise en contact avec ta collègue Amélie à qui j'ai pu acheter ma Cici.

Je remercie enfin tous les doctorants et personnels d'autres équipes du CURS avec qui j'ai échangé, collaboré ou bien qui m'ont formée sur des techniques : Merci à **Hakim** et **Louison** et **Cathy** de l'équipe Hematim, merci à **Marie**, **Véronique** et **François Helle** de l'équipe AGIR, merci à **Gaëlle**, **Cédric** et les doctorants du laboratoire MP3CV, et enfin grand merci à **Grégory**, **Damien**, **Sophie**, **Anoïsia** et **Ingrid** du GRAP.

Je remercie **monsieur David Durand** de m'avoir mise en contact avec le Journal The Conversation France. Merci beaucoup pour tous nos échanges scientifiques et de vulgarisation de la Science.

J'adresse de sincères remerciements aux membres de la Fondation Evertéa et de la SFSE qui m'ont soutenue à plusieurs reprises pendant ces années de thèse, merci à **monsieur Philippes Garrigues**, merci **Delphine**, **Damien**, **Manon**, **Pierre** et **Mathieu**. Je vous remercie d'avoir valorisé mes travaux de doctorat par le prix jeune chercheuse, par l'interview et la vidéo diffusées sur Youtube. Merci aussi pour les invitations aux 10 ans de la Fondation Evertéa à Valence et à la conférence à Lyon.

En cette fin de thèse mes pensées se tournent avec gratitude vers mes professeurs et mes encadrants de stage au cours des années passées dans mon pays, durant ma licence de biochimie et mon master de recherche en génomique et protéomique fonctionnelles. Je remercie vivement mes professeurs à l'Université Saint-Joseph de Beyrouth qui ont grandement nourri ma passion à la Science et à la recherche et qui continuent à diffuser leurs connaissances et avancer la recherche au Liban malgré la situation actuelle. Je remercie **monsieur Richard Maroun**, **madame Mireille Kallassy-Awad**, **madame Zeina Hobeika** et **madame Laure El Chamy**. Je vous remercie de votre soutien pendant 5 ans à la faculté des Sciences et merci aussi à toute la famille FS. Merci de m'avoir transmis votre rigueur

scientifique. Vous avez été des mentors exceptionnels, et votre influence a marqué mon parcours académique et professionnel. Merci de m'avoir inspirée et encouragée à toujours viser plus haut.

Mes pensées se tournent également vers mon pays, mon **Liban**. Tu as été, pendant 24 ans, le berceau de mes rêves et le témoin de mes premiers pas vers l'avenir. Même si les chemins m'ont éloignée de toi, ton influence est indélébile, et sache que je te porte en moi, où que j'aie. J'ai mis une distance de sécurité entre nous, une distance géographique mais tu es toujours dans le cœur et dans l'esprit.

Je remercie toutes les personnes qui ont fait de la **France** ma deuxième maison, merci de m'avoir accueillie, protégée et entourée d'une chaleureuse famille. Merci de m'avoir offert un environnement propice à l'épanouissement personnel et académique.

A ma famille au Liban, ma mère, mon père et mon frère, ma nièce, mes neveux, ma belle-sœur et ma grand-mère ; **A ma famille en Italie**, ma sœur, mon beau-frère et mon adorable neveu,

Vous avez donné au nom famille un sens et aujourd'hui je voudrais vous remercier.

Merci pour toutes les ondes positives que vous m'envoyiez à chaque appel vidéo. Merci de votre soutien et de votre présence à mes côtés malgré la distance. Merci de votre accueil chaleureux à chaque fois que je rentre durant les vacances. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, c'est grâce à toi maman. Merci de m'avoir épaulée toutes ces années, de veiller à mon bien-être et d'être toujours à l'écoute. Votre amour et votre encouragement sont des piliers essentiels dans ma vie. Vous avez su me donner la force de persévérer et de croire en moi. Chaque sourire, chaque mot de réconfort, chaque geste de tendresse a compté plus que vous ne pouvez l'imaginer. Je vous suis éternellement reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. « Dans la vie, on ne choisit pas sa famille, moi je la choisirai elle sans hésitation. »

A mes amis au Liban, **Céline, Woody, Rita, Hera** et **Marco**, merci pour tous vos messages d'encouragements et merci pour toutes les belles rencontres qui m'ont permis de souffler quand je rentrais durant les vacances. Merci de votre compréhension quand je n'ai pas pu vous accorder autant de temps que je l'aurais souhaité pendant ma thèse. Je pense ici aussi à une amie en France, **Audrey**, avec qui j'ai fait connaissance à mon arrivée à Arras. Audrey merci beaucoup de m'avoir choisie comme amie, tu as été à mes côtés depuis le début de cette nouvelle vie et tu y es encore, merci !

Pour finir, je remercie mon chéri et l'amour de ma vie, mon **So**, la personne qui fait maintenant partie de ma vie et de ma famille et sans qui je ne pourrai envisager de construire un avenir. Cette personne est **Sophian Zarqaoui—Tricotteaux**. So, mon amour, depuis que tu es entré dans ma vie, tu es celui qui illumine mon quotidien, tu es mon confident et ma source d'inspiration. Ton arrivée au laboratoire PériTox pour ton stage de master 2 a comblé un vide et a apporté une plénitude que je n'avais jamais connue. J'ai été très heureuse de t'avoir parmi nous avec les stagiaires que j'encadrais. L'aide que tu me fournissais était plus qu'une simple aide, c'était une présence, un soutien indéfectible. J'ai beaucoup apprécié nos échanges scientifiques et les moments que nous avons partagés au laboratoire : lors des manips de coloration, d'ensemencements des cryobilles (que tu projetais sur le PSM pendant ton apprentissage et on éclatait de rire...), du travail sur le SHIME de qui on s'occupait comme notre enfant ; au bureau, en parlant de Science, où j'ai perçu ta passion pour ton sujet, pour la génétique,...et tant d'autres choses grâce auxquelles je me suis rendu compte à quel point nous nous ressemblons ; dans la salle de pause, où on aimait travailler (paradoxalement à « salle de pause » mais c'est là où on trouvait un espace de calme et de paix) chacun devant son ordinateur, partageant un thé, notre boisson préférée. C'était un moment que nous attendions avec impatience, surtout après les vacances, et ton entrée en doctorat a rendu ces moments encore plus spéciaux. Ce mois-ci, nous fêterons nos 11 mois ensemble. Je voudrais te remercier d'avoir rendu ma troisième année de thèse la meilleure de ce doctorat. Merci de m'avoir soutenue, encouragée, épaulée, inspirée. Merci de m'avoir accordé ta

compréhension, ta tendresse et ton amour pendant les moments difficiles de cette thèse, merci d'avoir géré la maison et merci pour tous les repas préparés avec amour. Merci d'avoir célébré ensemble nos réussites. Merci à l'intérêt que tu portes à ma famille et merci de m'avoir permis de faire partie de ta famille que je remercie beaucoup : merci à ta mère Agnès et à Jean-Christophe pour leur soutien, merci aussi à ton père d'avoir pris de nos nouvelles.

Mon chéri, merci pour tout, hier c'était toi seul, c'était moi toute seule, aujourd'hui c'est nous deux jusqu'à la fin, tu es et resteras le compagnon de ma vie.



Cette thèse a été réalisée au sein de l'Université Picardie Jules Verne (UPJV), dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire PériTox – Périnatalité & Risques Toxiques – UMR_I 01 UPJV/INERIS - Unité mixte INERIS, Centre Universitaire de Recherche en Santé (CURS), 80054 Amiens, et le laboratoire de la barrière hémato-encéphalique (LBHE) UR 2465, Université d'Artois, 62300 Lens.

Ce projet constitue la première collaboration entre ces deux laboratoires dans le but d'étudier les effets des résidus de pesticides sur le microbiote intestinal et les barrières intestinale et hémato-encéphalique (projet PESTIMICROBAR). Il s'inscrit dans le cadre du projet PESTAMIC/MOSOPS, sous l'encadrement de mesdames Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet. Ce projet de recherche a bénéficié d'un financement par une allocation de recherche octroyée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, par la région Hauts-de-France et des universités de l'Alliance A2U, dans le cadre du projet CPER MOSOPS 2021-2027. Une allocation régionale a été accordée par le Conseil régional du Nord-Pas-de-Calais (50 %), de l'Université de Picardie Jules Verne (25 %) et de l'Université d'Artois (25 %).



Résumé

Avec l'utilisation croissante des produits phytosanitaires, l'exposition de la population aux résidus de pesticides est en hausse dans le monde, particulièrement dans la région agricole des Hauts-de-France, malgré les réglementations limitant leur utilisation. Les études épidémiologiques et expérimentales ont souligné que l'exposition à une alimentation déséquilibrée contenant des résidus de pesticides, pendant la période périnatale, crée un environnement à risque pour la femme enceinte et le nouveau-né. Cela entraîne des maladies chroniques au cours de la croissance voire à l'âge adulte. Les barrières intestinale (BI) et hémato-encéphalique (BHE), qui limitent le passage des molécules délétères, sont particulièrement exposées. Le microbiote intestinal (MI) joue un rôle clé dans la régulation de ces contaminants alimentaires. Des études animales récentes montrent que la dérégulation du MI par les pesticides altère la fonction de la BI et a des effets à long terme sur la BHE, en raison de la connexion bidirectionnelle entre ces 3 éléments : l'axe microbiote-intestin-cerveau. Cela soulève des questions sur les mécanismes par lesquels ces perturbations intestinales affectent la santé et le cerveau, et comment réduire les effets de ces xénobiotiques. Dans le but d'étudier les effets d'une exposition chronique aux pesticides, en particulier l'insecticide Chlorpyrifos (CPF), sur le MI et les conséquences sur la BI et la BHE, deux approches complémentaires ont été adoptées. La première est une étude *in vivo* de rates gestantes et leur descendance. La deuxième est une approche mécanistique combinant 3 modèles *in vitro* humains : le modèle SHIME® (Simulateur de l'écosystème microbien intestinal), un modèle de BI de cellules épithéliales Caco-2 et un modèle de co-culture de la BHE. Dans le but de contrer les effets des résidus de pesticides, une stratégie de prévention utilisant un prébiotique, l'inuline, a été mise en place. Les résultats montrent que l'exposition au CPF perturbe l'équilibre du MI (dysbiose intestinale), altérant la perméabilité de la BI et induisant une translocation bactérienne vers les organes stériles chez la rate gestante. Cette exposition perturbe également le profil d'expression des jonctions serrées et des molécules d'adhésion des microvaisseaux cérébraux chez la mère et la descendance. En parallèle, l'exposition chronique des modèles *in vitro* au CPF entraîne une dysbiose intestinale progressive dans le colon, marquée par l'augmentation des bactéries potentiellement pathogènes au détriment des bactéries bénéfiques. Une augmentation de la perméabilité de la BI associée à une translocation bactérienne, a été observée, mais pas pour la BHE. La supplémentation en inuline rétablit l'équilibre du MI et prévient les effets délétères du pesticide sur la BI et BHE.

Mots clés : Pesticides, prébiotiques, axe microbiote-intestin-cerveau, barrières, période périnatale, dysbiose intestinale, translocation bactérienne, perméabilité, modèle *in vivo* de rat, modèles *in vitro* humains

Abstract

With the increasing use of phytosanitary products, population exposure to pesticide residues is on the rise worldwide, particularly in the agricultural region of Hauts-de-France, despite regulations limiting their use. Epidemiological and experimental studies have highlighted that exposure to an unbalanced diet containing pesticide residues during the perinatal period creates a risky environment for pregnant women and newborns. This can lead to chronic diseases during growth and even into adulthood. The intestinal barrier (IB) and the blood-brain barrier (BBB), which limit the passage of harmful molecules, are particularly exposed. The gut microbiota (GM) plays a key role in regulating these food contaminants. Recent animal studies show that pesticide-induced dysregulation of the GM disrupts IB function and has long-term effects on the BBB, due to the bidirectional connection between these three elements: the gut microbiota-brain axis. This raises questions about the mechanisms through which intestinal disturbances affect health and the brain, and how to reduce the effects of these xenobiotics. To study the effects of chronic pesticide exposure, particularly the insecticide Chlorpyrifos (CPF), on the GM and its consequences on the IB and BBB, two complementary approaches were adopted. The first is an *in vivo* study of pregnant rats and their offspring. The second is a mechanistic approach combining three *in vitro* human models: the SHIME® model (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), a Caco-2 epithelial cell IB model, and a BBB co-culture model. To counter the effects of pesticides, a prevention strategy using the prebiotic inulin was implemented. The results showed that CPF exposure disrupts the balance of the GM (intestinal dysbiosis), altering IB permeability and inducing bacterial translocation to sterile organs in pregnant rats. This exposure also disrupts the expression profile of tight junctions and adhesion molecules in cerebral microvessels in both mothers and offspring. Additionally, chronic exposure of the *in vitro* models to CPF leads to a progressive intestinal dysbiosis in the colon, marked by an increase in potentially pathogenic bacteria at the expense of beneficial flora. An increase in IB permeability, associated with bacterial translocation, was observed, though not for the BBB. Inulin supplementation restores GM balance and prevents pesticide adverse effects on the IB and BBB.

Keywords: Pesticides, prebiotics, gut microbiota-brain axis, barriers, perinatal period, intestinal dysbiosis, bacterial translocation, permeability, rat *in vivo* model, *in vitro* human models

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

VALORISATION DES TRAVAUX DE THÈSE

I. Publication en 1^{er} auteur

1. Revue bibliographique

Maria Abou Diwan; Marwa Lahimer; Véronique Bach; Fabien Gosselet; Hafida Khorsi-Cauet[†] and Pietra Candela[†], Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota–Blood–Brain Barrier Axis: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 6147. <https://doi.org/10.3390/ijms24076147> (IF: 4.9)

2. Article scientifique

Maria Abou Diwan, Narimane Djekkoun, Marie-Christine Boucau, Aurélie corona, Lucie Dehouck, Maurice Biendo, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela[†] and Hafida Khorsi-Cauet[†], Maternal exposure to pesticides induces perturbations in the gut microbiota and blood–brain barrier of dams and the progeny, prevented by a prebiotic. *Environ Sci Pollut Res* (2024). <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34969-1> (IF: 5.1)

Maria Abou Diwan, Avénie Huet, Juliette Poiriez, Claire-Joly Condette, Stéphane Delanaud, Emmanuel Sevin, Aurélie corona, Larbi Rhazi, Flore Depeint, Halima Ouadid-Ahidouch, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela[†] and Hafida Khorsi-Cauet[†], Effects of Chlorpyrifos on gut dysbiosis and barriers integrity in women with a focus on pregnancy and prebiotic intervention: insights from advanced in vitro human models.

- *Environmental Pollution* (IF: 7.6), soumis le 29 octobre 2024 (accepté le 12 décembre 2024) [10.1016/j.envpol.2024.125533](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125533)

Maria Abou Diwan[#], Juliette Poiriez[#], Avénie Huet, Claire-Joly Condette, Stéphane Delanaud, Emmanuel Sevin, Halima Ouadid-Ahidouch, Véronique Bach, Fabien Gosselet, Hafida Khorsi-Cauet[†] and Pietra Candela[†], A novel in vitro human models' combination: are we closer to mimicking the gut-brain axis?

Journal of controlled release (IF: 10.5), soumission prévue en novembre 2024

II. Publications issues de collaboration

1. Revue bibliographique en 2^{ème} auteur

Marwa Lahimer, **Maria Abou Diwan**, Debbie Montjean, Rosalie Cabry, Véronique Bach, Mounir Ajina, Habib Ben Ali, Hafida Khorsi-Cauet and Moncef Benkhalifa, Endocrine disrupting chemicals and male fertility: from physiological to molecular effects. *Frontiers in Public Health* 2023 <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1232646> (IF: 3)

2. Revue bibliographique en 3^{ème} auteur

Sophian Tricotteaux-Zarqaoui, Marwa Lahimer, **Maria Abou Diwan**, Aurélie Corona, Pietra Candela, Rosalie Cabry, Véronique Bach, Hafida Khorsi-Cauet and Moncef Benkhalifa, Endocrine disruptor chemicals exposure and female fertility declining: from pathophysiology to epigenetic risks. *Frontiers in Public Health* 2024 12:1466967. doi: 10.3389/fpubh.2024.1466967 (IF: 3)

IV. Communications nationales et internationales

1. Communications orales

- **Journée annuelle de la Société Cerveau et Maladies cérébrovasculaires (SCMC), Paris, 16 juin 2022** « L'exposition chronique péri-gestationnelle au chlorpyrifos ± au régime obésogène entraîne des perturbations du microbiote intestinal et des propriétés de la BHE chez les rats femelles et leur progéniture » ; **Maria Abou Diwan**, Narimane Djekkoun, Marie-Christine Boucau, Aurélie Corona, Lucie Dehouck, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Hafida Khorsi-Cauet et Pietra Candela
- **13^{ème} congrès en santé environnement de la Société Francophone de Santé et Environnement (SFSE), Valence (Drôme), 23 au 25 novembre 2022 (Prix jeune chercheuse)** « L'exposition des rates gestantes au pesticide Chlorpyrifos seul ou en co-exposition avec un régime obésogène module les propriétés de la barrière hémato-encéphalique chez la progéniture » ; **Maria Abou Diwan**, Lucie Dehouck, Marie-Christine Boucau, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet (communication orale des résultats de thèse et discussion de l'impact des polluants sur l'environnement autour d'une table ronde avec différents chercheurs)
- **8ème Journée Amiénoise de Recherche en Santé, Institut Faire Faces, Amiens 19 janvier 2023** « Impact de la co-exposition chronique d'un pesticide et du régime obésogène en supplémentation à un prébiotique sur l'axe microbiote-intestin-cerveau chez les rats femelles et leur progéniture » ; **Maria Abou Diwan**, Narimane Djekkoun, Aurélie Corona, Marie-Christine Boucau, Lucie Dehouck, Maurice Biendo, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet
- **2ème Journée Diabète et Obésité des Hauts-de-France, Mégacité Amiens, 25 mai 2023** « Etude de l'effet d'une co-exposition à un pesticide et aux lipides saturés sur le microbiote intestinal et les propriétés de la barrière hémato-encéphalique » ; **Maria Abou Diwan**, Narimane Djekkoun, Aurélie Corona, Marie-Christine Boucau, Lucie Dehouck, Maurice Biendo, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet
- **Exposome en Toxicologie : du concept à la stratégie d'évaluation des risques (Colloque commun ARET-SFTG-STCM, jeudi 19 et vendredi 20 octobre 2023, Paris)** ; « Approche intégrée in vitro pour étudier l'impact des pesticides sur l'axe microbiote-intestin-cerveau »

Maria Abou Diwan, Stéphane Delanaud, Emmanuel Sevin, Aurélie Corona, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet

2. Communications affichées

- DOCTORIALES, Belle Dune, 7 au 10 juin 2022 « Combinaison de modèles in vivo et in vitro pour étudier la co-exposition des effets chroniques des pesticides et du régime obésogène en supplémentation d'un prébiotique (inuline) sur le microbiote intestinal et sur la barrière hémato-encéphalique chez des populations sensibles » **Maria Abou Diwan**, Narimane Djekkoun, Marie-Christine Boucau, Aurélie Corona, Lucie Dehouck, Stéphane Delanaud, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Hafida Khorsi-Cauet et Pietra Candela
- Journée Scientifique de la Société d'Etudes des Interfaces Sang-Cerveau (SEISC), Paris, France, 25 novembre 2022 « Effect of chronic peri-gestational exposure to chlorpyrifos, alone or in co-exposure with an obesogenic diet on the gut microbiota and the blood-brain barrier » **Pietra Candela**, Maria Abou Diwan, Narimane Djekkoun, Marie-Christine Boucau, Aurelie Corona, Lucie Dehouck, Stephane Delanaud, Fabien Gosselet, Veronique Bach, Hafida Khorsi-Cauet
- Les 10 ans de la Fondation Rovaltain, Valence (Drôme), 7 juin 2023 « Impact de la co-exposition chronique périnatale au pesticide Chlorpyrifos et à un régime obésogène sur l'axe microbiote-intestin-cerveau chez la rate gestante et la progéniture » **Maria Abou Diwan**, Narimane Djekkoun, Aurélie Corona, Marie-Christine Boucau, Lucie Dehouck, Maurice Biendo, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet
- 11th International Conference on Nutrition & growth, Lisbon, Portugal, 15 au 17 février 2024 (E-Poster) "Effects of pesticides on the gut microbiota-brain axis assessed by an integrated human in vitro approach" **Maria Abou Diwan**, Stéphane Delanaud, Emmanuel Sevin, Aurélie Corona, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela and Hafida Khorsi-Cauet

3. Conférences invitées

- Journée mondiale de l'alimentation (Quels systèmes alimentaires pour concilier santé, climat et biodiversité ?), Fondation Evertéa – SFSE et le CIRC, Lyon 16 octobre 2023 au CIRC « Alimentation et microbiote en liens avec pesticides et prébiotiques » ; **Maria Abou Diwan**, Stéphane Delanaud, Emmanuel Sevin, Aurélie Corona, Marie-Christine Boucau, Lucie Dehouck, Fabien Gosselet, Véronique Bach, Pietra Candela et Hafida Khorsi-Cauet

- 7th International Military Radiation and Innovation Symposium, 9 octobre 2024, Paris “Effects of pesticides on the gut microbiota-brain axis assessed by an integrated human in vitro approach” **Maria Abou Diwan**, Pietra Candela and **Hafida Khorsi-Cauet**

V. Vulgarisation scientifique

- Article de vulgarisation destiné au grand public dans le journal *The Conversation*, « Notre microbiote intestinal, cible collatérale des pesticides : focus sur les effets du chlorpyrifos » **Abou Diwan Maria**, Candela Pietra et Khorsi-Cauet Hafida (janvier 2024); <https://theconversation.com/notre-microbiote-intestinal-cible-collaterale-des-pesticides-focus-sur-les-effets-du-chlorpyrifos-215247>
- Vidéo filmée lors du 13^{ème} congrès de la Société Francophone de Santé et Environnement (SFSE) à Valence en novembre 2022, éditée et diffusée le 4 avril 2023 par la SFSE, « La co-exposition de rates gestantes au pesticide Chlorpyrifos et à un régime obésogène module le microbiote intestinal et les propriétés de la barrière hémato-encéphalique » <https://www.youtube.com/watch?v=kY6SCMRGuB4>
- Vidéo diffusée par la Fondation Evertéa le 12 avril 2023, « vidéo qui met en avant le travail d'un chercheur que la Fondation Evertéa a soutenu – prix jeune chercheuse » <https://www.youtube.com/watch?v=M0F2XOTB8ME>
- Participation dans un atelier de chercheurs dans les 10 ans de la Fondation Evertéa, Juin 2023
- Création d'un jeu du microbiote intestinal dédié à la vulgarisation aux jeunes de 7 à 10 ans de ce qu'est le microbiote et comment nous pouvons préserver sa santé (Fête de la Science)
- Participation au stand du Laboratoire PériTox, Bibliothèque Louis Aragon, Amiens, Fête de la Science, octobre 2022 et 2024
- Podcast diffusée sur radio campus, enregistré lors de la Fête de la Science de 2023 (halle des Sports, Etouvie)
- Participation au Forum des métiers au Lycée Sacré Cœur d'Amiens pour expliquer le métier de chercheur aux lycéens

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	5
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	17
TABLE DES MATIERES	22
LISTE DES FIGURES	25
LISTE DES TABLEAUX	28
ABBREVIATIONS	30
PREAMBULE	35
ETAT DE L'ART	38
Chapitre I : L'écosystème microbien intestinal, chef d'orchestre des fonctions du corps.....	38
A. Localisation et composition du microbiote intestinal	38
B. Mise en place du microbiote intestinal du fœtus jusqu'à l'âge adulte	39
C. Fonctions du microbiote intestinal.....	39
Chapitre II : La barrière intestinale	43
A. Localisation et structure de la barrière intestinale	43
B. La barrière intestinale, une barrière multifonctionnelle.....	44
Chapitre III : La barrière hémato-encéphalique	51
A. Les barrières du système nerveux central : l'importance de la BHE	51
B. L'embryogenèse : mise en place de l'architecture cellulaire de la BHE fœtale à la BHE adulte	52
C. Fonctions de la BHE.....	54
Chapitre IV : L'axe microbiote-intestin-cerveau.....	59
A. Homéostasie de l'axe microbiote-intestin-cerveau.....	59
B. La communication bidirectionnelle au sein de l'axe et le rôle du microbiote	59
Chapitre V : Pesticides et contaminants alimentaires.....	65
A. Utilisation des pesticides : introduction à l'impact du Chlorpyrifos sur l'environnement et la santé	65
B. Réglementations et limites d'utilisation des pesticides	69
C. Exposition de la population sensible aux contaminants alimentaires : qui est concerné ?.....	70
Chapitre VI : Conséquences de l'exposition du microbiote aux contaminants alimentaires	72
A. Impact des pesticides sur le microbiote intestinal et les barrières : Dysbiose et translocation bactérienne.....	72
B. Conséquences de l'exposition aux pesticides sur l'axe microbiote-intestin-cerveau : apparition de maladies à long terme	73
C. Exposition cocktail (combinaison de plusieurs pesticides ou avec des lipides saturés : régime High Fat Diet).....	75
Chapitre VII : Stratégie nutritionnelle préventive cible du microbiote intestinal et conséquences bénéfiques sur l'axe microbiote-intestin-cerveau : utilisation de prébiotique	78
A. Introduction aux prébiotiques et à leurs bienfaits	78
B. Rôle de l'inuline au sein du microbiote intestinal et conséquences sur les barrières et prévention de l'effet des pesticides.....	78
Revue bibliographique.....	81

Résumé.....	81
Revue bibliographique	82
Méthodologie générale	108
Etude in vivo (modèle rat)	108
A. Etude du MI.....	108
1. Etude de la dysbiose intestinale.....	108
2. Etude de la translocation bactérienne	109
<i>Sur le plan phénotypique</i>	109
<i>Sur le plan génotypique</i>	109
<i>Tests statistiques</i>	110
B. Etude de la BHE	111
1. Protocole d'extraction des microvaisseaux cérébraux	111
2. <i>Tests statistiques</i>	111
Etude in vitro (modèles in vitro humains)	112
A. Le modèle SHIME®.....	112
B. Le modèle de BI : cellules Caco-2.....	115
C. Le modèle de BHE : modèle de co-culture.....	115
D. Mesure de la perméabilité dans les modèles de la BI et la BHE.....	115
E. Etude de la viabilité cellulaire dans les modèles de la BI et la BHE par le test MTT	116
F. Etude de la translocation bactérienne dans les modèles de la BI et la BHE	116
Résumé	118
Article de l'approche in vitro.....	119
Résultats et discussion	139
Etude in vivo des effets du pesticide Chlorpyrifos et la prévention par l'inuline.....	139
A. Résumé	139
B. Article de l'étude in vivo	141
Etude in vitro des effets du pesticide Chlorpyrifos et la prévention par l'inuline	160
A. Résumé.....	160
B. Article de l'étude in vitro	162
C. Résultats complémentaires	192
Discussion générale	201
Conclusion et perspectives	209
Références bibliographiques.....	214

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition des genres bactériens qui résident et transitent le long du tractus digestif (adaptée de (Ruan et al. 2020)).	38
Figure 2: Principales voies métaboliques de fermentation des glucides par la microflore colique (Azpiroz et al. 2004; Oliphant and Allen-Vercoe 2019).	40
Figure 3: Composition de l'épithélium intestinal au contact avec le microbiote intestinal (version modifiée de Abou Diwan et al. 2023), Ig A : Immunoglobuline A	43
Figure 4: Barrière intestinale : barrière physique, immunitaire, de transport et de détoxification (Abou Diwan et al. 2023).	45
Figure 5: Les composants cellulaires de l'UNGV (Brown et al. 2019).	52
Figure 6 : Les différences entre les cellules endothéliales cérébrales (CEC) et les cellules endothéliales périphériques en termes de (A) structure des microvaisseaux (pas de fenestrations dans les CEC), Plus d'étanchéité (dans les CEC dans (B) que dans les cellules périphériques dans (C)) assurée par les jonctions serrées et (D) schématisation des fenestrations trouvées dans les cellules endothéliales périphériques (Profaci et al. 2020).	54
Figure 7: La barrière hémato-encéphalique est une barrière physique dotée de : jonctions serrées (permettant un passage paracellulaire sélectif), vésicules de transcytose, de pompes d'efflux et de transporteurs actifs (Saint-Pol et al. 2020).	55
Figure 8: Graphique chronologique indiquant les changements dans la diversité microbienne au cours de la vie humaine, en parallèle aux stades de développement du cerveau (Cryan et al. 2019).	59
Figure 9: Métabolisme des AGCC provenant de la fermentation des fibres alimentaires et leur passage dans la circulation (Dalile et al. 2019). SCFA : Short chain fatty acids = AGCC, MCT1 : Monocarboxylate Transporter 1.	61
Figure 10: Implication de la communication multidirectionnelle entre le microbiote et le cerveau dans les fonctions neurologiques (Cryan and Dinan 2012). ACTH : adrenocorticotrop hormone; CRF : corticotropin-releasing factor.	62
Figure 11: Mécanismes de communication par les métabolites bactériens et la voie de l'inflammasome au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans des conditions physiologiques.	63
Figure 12: Classification des pesticides, adapté de (Thany et al. 2013).	65
Figure 13: Evolution de l'utilisation des pesticides en kg/ hectare des continents, de 1990 à 2020 (FAOSTAT 2022).	66
Figure 14: Représentation de l'intensité d'utilisation géographique de pesticides en France (Solagro).	67
Figure 15: Biotransformation du Chlorpyrifos (Supreeth and Raju 2017).	68
Figure 16: La perturbation de la voie de communication des métabolites bactériens et la voie de l'inflammasome au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans des conditions physiopathologiques (Rutsch et al. 2020).	74
Figure 17: Contribution des aliments végétaux à l'exposition aux résidus de pesticides($\mu\text{g/kg p.c/jour}$), 1 : omnivores, 2 : pesco-végétariens, 3 : végétariens, 4 : Vegan (Baudry et al. 2021).	75
Figure 18: Emergence des maladies liées aux expositions cocktails aux facteurs environnementaux (Di Vincenzo et al. 2023).	76
Figure 19: Effets des pesticides sur l'environnement et la santé de l'axe microbiote-intestin-cerveau pendant la période périnatale et la prévention par l'inuline. (Création personnelle sur BioRender, publiée dans The Conversation France)	80
Figure 20: Etapes de l'étude de la translocation bactérienne sur le plan génotypique	109

Figure 21: Etapes principales du protocole d'extraction des fractions de microvaisseaux enrichies en cellules endothéliales	111
Figure 22: Résultats de l'étude par q PCR du CPF et de la supplémentation en inuline sur le MI de femmes enceintes	192
Figure 23: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore totale du MI de femmes non enceintes	194
Figure 24: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore potentiellement pathogène du MI de femmes non enceintes	195
Figure 25: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore bénéfique du MI de femmes non enceintes	196
Figure 26: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore potentiellement pathogène du MI chez les femmes enceintes	197
Figure 27: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore potentiellement pathogène du MI chez les femmes enceintes	198
Figure 28: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore bénéfique du MI chez les femmes enceintes	199

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour la q PCR de l'ADN bactérien du SHIME	114
Tableau 2: Tableau représentant des résultats préliminaires de dosage de métabolites microbiens neuroactifs.....	211

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

5-HT	5-hydroxytryptamine / Sérotonine
ABC	ATP-Binding Cassette
ACh	Acétylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGCC	Acide Gras à Chaines Courtes
Ahr	Récepteur des Hydrocarbures Aryliques
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AMIC	Axe Microbiote Intestin Cerveau
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BCP	Bromocrésol pourpre
BEA	Bile Esculine Azide
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BDNF	Facteur Neurotrophique Dérivé du Cerveau
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BI	Barrière intestinale
BMP	Protéines Morphogénétiques Osseuses
C	Celsius
CCK	Cholécystokinine
CEC	Cellules endothéliales cérébrales
<i>Cldn3</i>	Claudine 3
<i>Cldn5</i>	Claudine 5
cm	Centimètre
CO₂	Dioxyde de carbone
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase
CPF	Chlorpyrifos
CUMS	Chronic Unpredictable mild stress
CYP	Cytochrome P450

D21	Jour 21
D60	Jour 60
DAMP	Motifs Moléculaires Associés aux Dommages
DDT	Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane
DEP	Diéthylphosphate
DETP	Diéthylthiophosphate
DJA	Dose Journalière Admissible
DL50	Dose Létale 50/médiane
dNTPs	Deoxynucleotides triphosphate
DOHaD	Developmental Origin of Health and Diseases
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESAF	Autorité Européenne De Sécurité Des Aliments
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FGF	Facteur de Croissance des Fibroblastes
FOS	Fructo-Oligosaccharides
g	Gramme
GABA	Acide γ -aminobutyrique
<i>GAPDH</i>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GLUT1	Glucose Transporter 1
GOS	Galacto-Oligosaccharides
GST	Glutathion S-transférases
h	Heure
HCO₃⁻	Ion Bicarbonate
HFD	High Fat Diet
ICAM	Molécules d'Adhésion Intercellulaire
IgA	Immunoglobuline A
IL-1β	Interleukine 1 bêta
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
IL-10	Interleukine 10

IL-17	Interleukine 17
IL-18	Interleukine 18
JS	Jonctions serrées
KDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramme
L	Litre
LCS	Liquide Céphalorachidien
LMR	Limite Maximale de Résidus
Log	Logarithme
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocytes T
M	Microfold
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MAO	Monoamine oxydase
MEC	Matrice Extracellulaire
MI	Microbiote Intestinal
min	minute
mg	milligramme
µg	microgramme
mL	millilitre
µL	microlitre
µm	micromètre
MRP	Protéines de Résistance aux Médicaments Multiples
MSA	Mannitol Salt Agar
MTC1	Transporteur monocarboxylate 1
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF-κB	Nuclear factor kappa-B
ng	nanogramme
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
nm	nanomètre
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level
OMS/ WHO	Organisation Mondiale de la Santé/ World Health Organization
PAMP	Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes

PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes
P-gp	P Glycoprotein
PON1	Paraoxonase 1
PYY	Peptide YY
q PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAPD-PCR	Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction
RASFF	European Rapid Alert System for Food and Feed
RNase	Ribonuclease
RT- q PCR	Reverse Transcription - Quantitative Polymerase Chain Reaction
SGLT1	Transporteur sodium-glucose
SHIME	Simulateur de l'écosystème microbien intestinal
SNC	Système Nerveux Central
SNE	Système Nerveux Entérique
TCP	3,5,6-trichloro-2-pyridinol
TGF-β	Facteur de Croissance Transformant bêta
TGI	Tractus Gastro-Intestinal
TLR	Recepteur Toll-Like
TNF-α	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
TOS	Trans-galacto-oligosaccharides
T-regs	Regulatory T cells
TRPC4	Transient Receptor Potential Canonical Channels (canaux ioniques transitoires potentiels canoniques)
UNGV	Unité neuro-glio-vasculaire
UFC	Unité formant colonie
VCAM	Molécules d'Adhésion des Cellules Vasculaires
VEGF	Facteurs de Croissance Endothéliaux Vasculaires
VTR	Valeurs Limites Toxicologiques
ZO	Zonula Occludens

PRÉAMBULE

PRÉAMBULE

L'utilisation des pesticides a considérablement augmenté au niveau mondial au cours des dernières décennies. Selon la FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), la consommation mondiale de pesticides a presque doublé entre 1990 et 2018, passant à plus de 2,5 millions de tonnes (FAO 2024). Cette augmentation est en partie due à la nécessité de maintenir des rendements agricoles élevés face aux défis climatiques, aux ravageurs et la croissance démographique (Sabzevari and Hofman 2022). Cette exposition accrue aux pesticides pose des risques significatifs pour l'environnement et la santé humaine. En effet, les pesticides sont identifiés comme des facteurs environnementaux perturbateurs de l'homéostasie, surtout durant la période périnatale. Cette période, qui englobe la grossesse et les premiers 1000 jours de vie, est une phase de développement critique et se caractérise par une plasticité maximale et une sensibilité accrue aux facteurs environnementaux. L'exposition aux pesticides pendant cette période peut avoir des effets délétères sur la santé de la mère et de l'enfant en créant un environnement à risque qui est à l'origine de maladies chroniques à l'âge adulte (Concept de la DOHaD : Developmental Origin of Health and Diseases) (Wright 2017).

Ces molécules peuvent atteindre la population à travers l'air, l'eau et le sol. L'exposition aux pesticides se fait donc principalement par inhalation, absorption cutanée et par ingestion. Cette dernière, étant la plus courante, est due à la consommation de nourriture contenant des résidus de pesticides. Les études expérimentales portent souvent sur les effets d'une exposition aiguë à un seul pesticide alors que la population est continuellement exposée à des cocktails de pesticides, parfois à faibles doses, dont les effets sont peu/pas connus. En particulier, les effets de ces cocktails sur les barrières fonctionnelles de notre organisme ne sont pas connus, qu'il s'agisse de la population générale ou, plus particulièrement, des populations vulnérables comme les femmes enceintes. La barrière intestinale (BI), la barrière hémato-encéphalique (BHE) et le microbiote intestinal (MI) jouent un rôle important dans l'absorption et l'accès de contaminants alimentaires vers le cerveau.

Comme le disait Hippocrate « *Toute maladie commence dans l'intestin* », de nos jours nous sommes conscients que toute exposition aux contaminants alimentaires commence au sein du MI. Ce microbiote regroupe les microorganismes résidents dans le tractus digestif. Il est considéré comme un acteur majeur dans diverses fonctions physiologiques du corps : digestive, métabolique, immunitaire, endocrinienne allant jusqu'au cerveau. La communauté microbienne crée des relations bénéfiques avec les cellules du corps que l'on nomme symbiose et on dit qu'elle est en « eubiose » (équilibre). Face à une exposition chronique à des facteurs perturbateurs de l'homéostasie, les « résidents » de l'intestin passent à un état dit « dysbiose ». Il s'agit d'un déséquilibre de la flore intestinale qui se caractérise par une augmentation des bactéries potentiellement pathogènes au détriment des bactéries bénéfiques. Cela met en danger la santé de l'Homme notamment les populations sensibles telles les femmes enceintes mais aussi la femme en âge de procréer qui est potentiellement une future femme enceinte, la santé du nouveau-né étant conditionnée par celle de la mère et ce même précédent sa conception. La question qui se pose est

comment ces perturbations intestinales induites par les pesticides mettent en danger la santé d'un individu et sa descendance ? Comment atteignent-elles le cerveau ? Existe-t-il une communication directe entre le MI et le cerveau ? Comment peut-on réduire les effets de ces xénobiotiques sur la santé ?

Dans le but de répondre à ces questions et comprendre la communication entre les bactéries et le cerveau, l'objectif principal de ma thèse est d'étudier des effets chroniques du pesticide Chlorpyrifos, ainsi que les effets d'un cocktail de pesticides sur la communauté bactérienne du MI et les répercussions sur la BI et la BHE. Afin de concrétiser cet objectif, nous avons adopté deux approches *in vivo* (rates gestantes et la descendance) et *in vitro* combinant trois modèles humains : le modèle SHIME® (Simulateur de l'écosystème microbien intestinal), un modèle de BI de cellules épithéliales Caco-2 et un modèle de BHE (co-culture de cellules endothéliales et péricytes humains). Dans le but de contrer les effets des pesticides (objectif secondaire), nous avons réalisé une stratégie de prévention à l'aide d'un prébiotique, l'inuline.

ÉTAT DE L'ART

Chapitre I : L'écosystème microbien intestinal, chef d'orchestre des fonctions du corps

A. Localisation et composition du microbiote intestinal

Dépassant de 10 fois le nombre de cellules du corps, le microbiote intestinal (MI) désigne l'ensemble des microorganismes colonisant le tractus digestif. Le MI n'est pas une simple communauté microbienne mais un écosystème dynamique caractérisé par la complexité et la diversité des microorganismes (3 millions de gènes contre 23 000 dans le génome humain), les interactions entre eux et avec les cellules de l'hôte (Valdes Ana M et al. 2018). Parmi les microbiotes buccal, cutané, vaginal ; le MI représente la flore la plus peuplée du corps. Composé principalement de 10^{14} bactéries des phyla *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*) et *Bacteroidota*, le MI regroupe aussi des virus, des champignons, des levures et des archées (Matsuzaki et al. 2023). La composition du MI est hétérogène le long des segments intestinaux, variant en fonction des conditions préférentielles de croissance et physico-chimiques notamment la température, le pH et la quantité de dioxygène et de nutriments disponibles (Dinan and Cryan 2017; Thursby and Juge 2017). Il existe un gradient d'acidité et de dioxygène qui diminue depuis l'estomac jusqu'au colon favorisant la croissance des bactéries anaérobies dans le colon, le segment intestinal le plus riche en micro-organismes (Fig. 1).

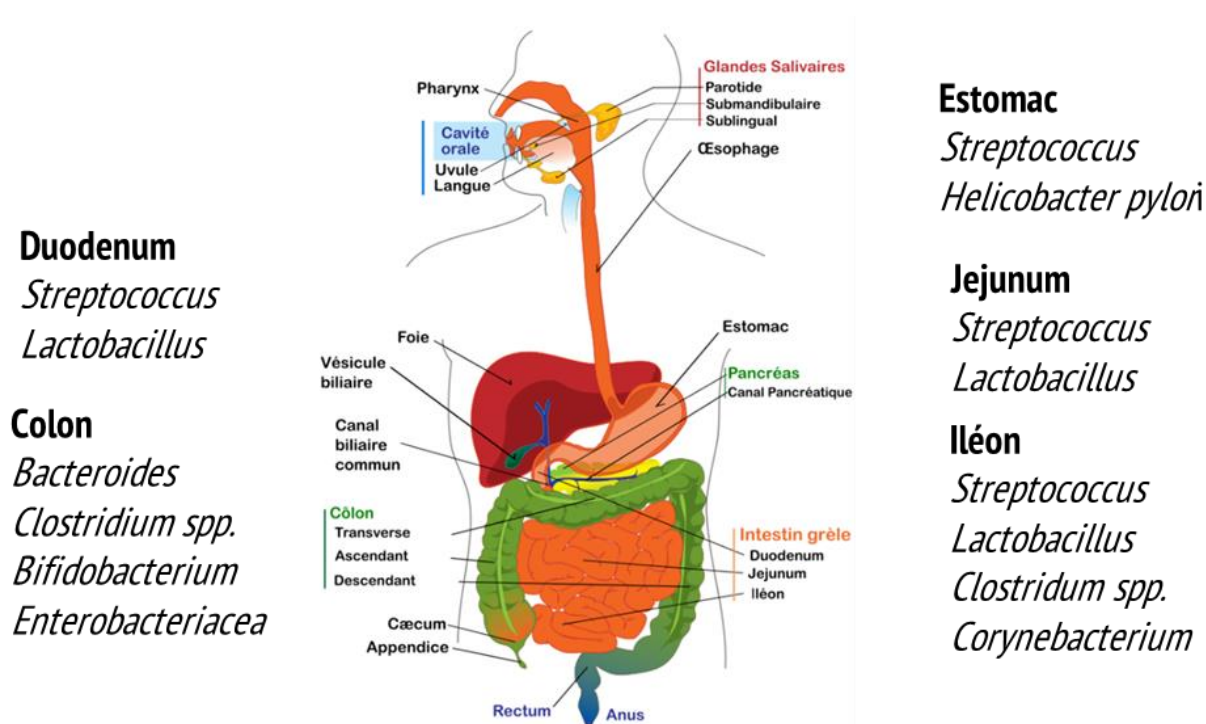


Figure 1: Répartition des genres bactériens qui résident et transitent le long du tractus digestif (adaptée de (Ruan et al. 2020)).

Ces 10^{14} bactéries colonisant l'intestin présentent non seulement différents types respiratoires (aérobie et anaérobie), mais aussi différentes formes (coques et bacilles) et différents types de paroi bactérienne entre les Gram + (couche de peptidoglycane très épaisse) et les Gram – (riche en lipopolysaccharides).

B. Mise en place du microbiote intestinal du fœtus jusqu'à l'âge adulte

On a longtemps considéré que l'utérus est un milieu stérile et que la colonisation de l'intestin du fœtus par les bactéries ne commence qu'à la naissance. Des études récentes suggèrent que le fœtus rencontre des bactéries provenant du MI de sa mère rejoignant le placenta et le liquide amniotique (Butel et al. 2018; Anwar et al. 2020). La composition du MI va donc dépendre de celle de la mère. Le mode d'accouchement, par voie vaginale ou césarienne, impactera également la composition du MI (Rinninella et al. 2019). Le profil bactérien simple durant les premiers jours de la vie, composé principalement des *Entérobactéries* et des *Bifidobactéries* du MI de la mère, devient complexe avec le temps (Campeotto et al. 2007). Sa composition évoluera à la suite de la naissance en fonction de l'âge gestationnel, du mode d'alimentation du nouveau-né (lait maternel et/ou artificiel), du régime alimentaire et les facteurs environnementaux absorbés par l'organisme, d'où la différence inter-individuelle (Backhed et al. 2015; Rinninella et al. 2019; Anwar et al. 2020). Le nouveau-né allaité présente un microbiote riche en *Bifidobactéries* et une installation de *Clostridium* retardée par rapport à un enfant nourri au lait artificiel, grâce à la défensine, lactoferrine et caséine du lait maternel (Campeotto et al. 2007; Jost et al. 2015; Buffet-Bataillon et al. 2021). La flore microbienne d'un individu lui est donc propre et devient stable entre l'âge de 2 à 4 ans. Malgré cette différence de composition du MI entre les individus, les diverses fonctions du corps auxquelles vont activement participer ces 10^{18} microorganismes, sont les mêmes entre individus. Les fonctions essentielles sont assurées par les espèces identiques entre tous les individus (INSERM 2021).

C. Fonctions du microbiote intestinal

1. La place occupée par le microbiote intestinal

La fonction primordiale du MI est son installation au sein du tractus digestif. La place occupée par ces microorganismes qui sont pour la plupart, potentiellement bénéfiques, va empêcher la colonisation de pathogènes, d'où le rôle de barrière physique (Jovel et al. 2018). De plus, cette présence est essentielle pour le développement, l'entretien et la maturation épithéliale du tractus digestif.

2. Rôle métabolique du microbiote dans l'assimilation des nutriments et la fermentation des aliments non digestibles

Pour survivre, les bactéries puisent des substrats présents dans notre alimentation. En retour, elles nous rendent service en digérant des aliments que les enzymes de notre corps ne peuvent pas dégrader. La digestion des aliments dans l'intestin dépend en grande partie des bactéries du MI, les enzymes digestives bactériennes étant bien plus nombreuses que les enzymes sécrétées par l'organisme (Oliphant

and Allen-Vercoe 2019). En effet, le nombre de protéases produites par les bactéries dépassent celui des protéases humaines. De plus, le MI possède plus de 260 glycosides hydrolases permettant la digestion des oligosaccharides constituant les fibres alimentaires non digestibles par les enzymes du corps humain (Santhiravel et al. 2022). Les « résidents » de l'intestin participent également à la synthèse de la vitamine K, certaines vitamines B et des acides aminés essentiels.

3. La production de métabolites bactériens bénéfiques pour la muqueuse et la barrière intestinale

La digestion par les bactéries est essentielle pour l'apport d'énergie au corps et la production de métabolites bénéfiques. La digestion des oligosaccharides entraîne la production de pyruvate qui sera catabolisé en acétyl-CoA, succinate ou lactate ou bien métabolisé en acides gras à chaînes courtes (AGCC) : acétate, propionate et butyrate. L'acétate est l'AGCC majoritaire selon le ratio (60 acétate:20 propionate:20 butyrate) et il est le précurseur de la production de butyrate (Dalile et al. 2019; Zhang et al. 2023b). Le propionate est principalement produit par la voie du succinate (Fig. 2).

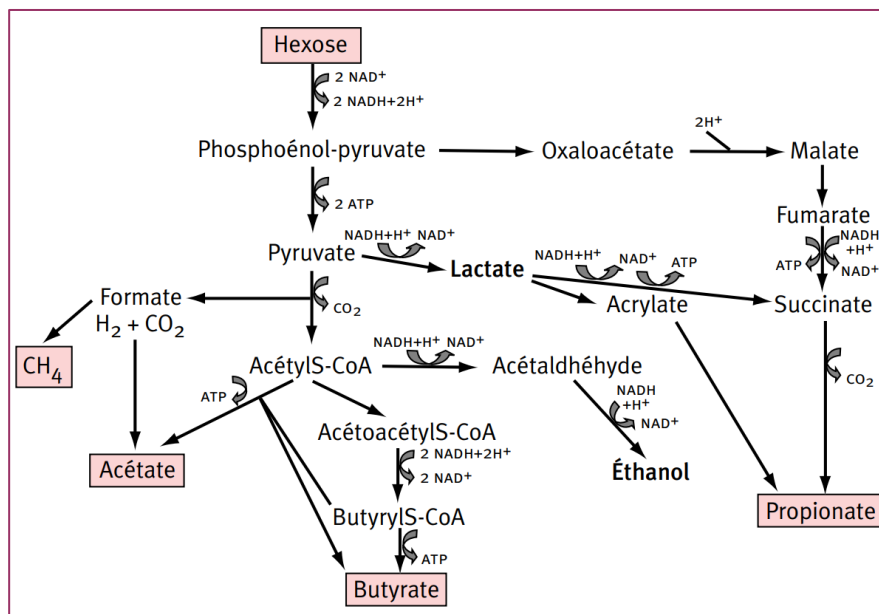


Figure 2: Principales voies métaboliques de fermentation des glucides par la microflore colique (Azpiroz et al. 2004; Oliphant and Allen-Vercoe 2019).

L'espèce bactérienne *Bacteroides thetaiotaomicron* produit l'acétate et le propionate, alors que le butyrate est produit par les clusters IV et XIV de *Clostridium* (principalement *Faecalibacterium prausnitzii*) (Guo et al. 2020; Martín et al. 2023). C'est à travers les AGCC que les interactions locales s'élargissent et le MI communique avec des organes distants.

4. La maturation du système immunitaire

Bien que les « résidents » de l'intestin exercent des fonctions simples comme la digestion, ils sont de même capables d'assurer des rôles bien plus complexes. Le MI joue un rôle fondamental dans la maturation et la régulation du système immunitaire. Ce processus commence dès la naissance et évolue

tout au long de la vie (Stilling et al. 2014). Le MI stimule le système immunitaire inné au début de la vie qui conduit à la maturité du tissu lymphoïde lié à l'intestin et inspire l'immunité acquise en stimulant les réponses immunitaires locales et systémiques, la synthèse intestinale et le métabolisme de certains nutriments (Round and Mazmanian 2009). Les bactéries stimulent les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale : les cellules dendritiques et les macrophages. Celles-ci présentent les antigènes aux lymphocytes T (LT) pour initier une réponse immunitaire (Takiishi et al. 2017).

Le microbiote régule, de plus, la production de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10 et impliquées dans la défense contre infections comme IL-17. De manière intéressante, le MI peut prévenir les réponses auto-immunes et maintenir la tolérance immunitaire en différenciant les LT en cellules T régulatrices (Treg). Prenons comme exemple *Bacteroides fragilis* qui, grâce à son polysaccharide A, entraîne une réponse T-reg produisant la cytokine IL-10 pour protéger de l'inflammation causée par *Helicobacter hepaticus* (Round and Mazmanian 2009). Il agit également à l'échelle des lymphocytes B en stimulant leur production d'immunoglobulines A (IgA) neutralisant les pathogènes et les toxines dans la lumière intestinale.

5. Protection et régénération de la barrière intestinale

Outre son rôle dans la maturation du système immunitaire, le MI, bien qu'il soit séparé de la barrière intestinale (BI) par une couche de mucus, joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la BI grâce à une communication constante, soulignant son impact sur divers aspects de la physiologie intestinale. Des études récentes ont démontré que certaines bactéries bénéfiques, telles que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium*, peuvent renforcer les jonctions serrées (JS) entre les cellules épithéliales, réduisant ainsi la perméabilité intestinale (Torres-Maravilla et al. 2022). Produit par les bactéries lactiques *Lactobacillus*, le lactate peut être converti en butyrate par d'autres bactéries intestinales. Ce métabolite est une source d'énergie essentielle pour les cellules épithéliales du côlon. Il joue un rôle crucial dans l'augmentation de l'intégrité de la BI en renforçant les JS et stimulant la production de mucus par les cellules de Gobelet, contribue également à la réduction de l'inflammation (Akhtar et al. 2021). De plus, les AGCC produits par ces microorganismes, nourrissent les cellules de la muqueuse intestinale et favorisent leur régénération. En d'autres termes, les cellules épithéliales constituant la BI utiliseront ces métabolites comme source d'énergie. L'indole, métabolite issu du métabolisme du tryptophane par *Escherichia coli*, est également un AGCC qui renforce les JS entre les cellules épithéliales de la BI, réduisant ainsi la perméabilité intestinale face aux toxines et pathogènes (Thèse, Jaglin 2013). Ce métabolite exerce également un rôle protecteur de la BI en intervenant dans la régénération des cellules épithéliales endommagées et en contribuant à la réduction de l'inflammation (Thèse, Mir 2018).

Le tractus intestinal constitue la barrière principale entre le corps et son environnement. Le MI et la BI, séparés d'une couche de mucus, forment ensemble cette structure protectrice. La population microbienne intestinale interagit étroitement avec la BI, contribuant à maintenir son intégrité et à prévenir les dommages. En retour, la BI joue un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre les agents pathogènes et les toxines tout en permettant l'absorption des nutriments essentiels. Cette interaction complexe entre le MI et la BI est essentielle pour le maintien de la santé et de l'homéostasie de l'organisme.

Chapitre II : La barrière intestinale

A. Localisation et structure de la barrière intestinale

La BI est une structure complexe qui s'étend tout au long du tractus gastro-intestinal (TGI), depuis l'estomac jusqu'au rectum. La muqueuse intestinale est composée de trois couches principales : l'épithélium intestinal, la *lamina propria* et la musculaire muqueuse, chacune jouant un rôle spécifique dans la protection et le fonctionnement de l'intestin. L'épithélium intestinal, constitué de cellules épithéliales, les entérocytes, étroitement liées par des JS, des jonctions adhérentes et des desmosomes, forme une couche continue, monostratifiée et imperméable (Rohr et al. 2020). Ces cellules épithéliales sont recouvertes de microvillosités, qui augmentent considérablement la surface d'absorption et jouent un rôle crucial dans la digestion et l'absorption des nutriments. Les microvillosités sont également impliquées dans la sécrétion de mucus, qui est une substance viscoélastique, et d'enzymes digestives, contribuant ainsi à la protection de la BI. L'épithélium intestinal est donc recouvert de mucus, produit par les cellules caliciformes (cellules de gobelet) (Di Vincenzo et al. 2023). Cette couche cellulaire sert de première ligne de défense en piégeant les agents pathogènes et en limitant leur accès aux cellules épithéliales. Le mucus contient également des peptides antimicrobiens (secrétés par les cellules de Paneth situées au fond des cryptes intestinales) et des immunoglobulines sécrétoires (IgA) qui neutralisent les microbes. Le mucus constitue ainsi une barrière chimique assurant une protection contre les pathogènes. Les cellules entéroendocrines, disséminées le long de l'épithélium, sont responsables de la sécrétion de diverses hormones gastro-intestinales (Fig. 3).

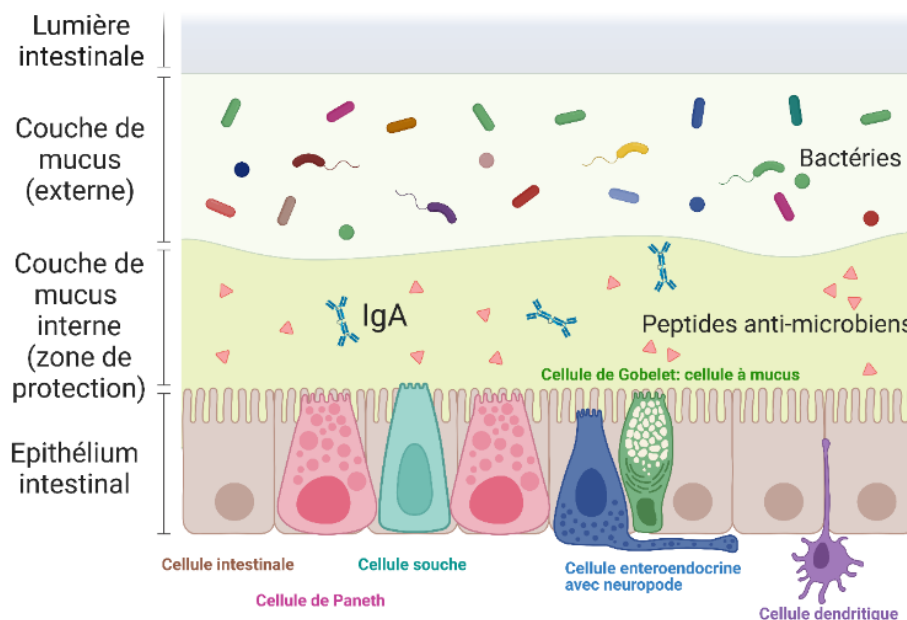


Figure 3: Composition de l'épithélium intestinal au contact avec le microbiote intestinal (version modifiée de Abou Diwan et al. 2023), Ig A : Immunoglobuline A

La *lamina propria* (couche de tissu conjonctif) sert de soutien structurel à l'épithélium tout en jouant un rôle crucial dans la réponse immunitaire intestinale. Elle se caractérise par la présence des T-regs

(Regulatory T cells) et des cellules dendritiques résidentes qui maintiennent un environnement anti-inflammatoire en sécrétant un cocktail de cytokines approprié.

Cette structure abrite aussi des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les vaisseaux sanguins permettent la perfusion des nutriments absorbés au niveau de l'épithélium vers la circulation systémique (Spadoni et al. 2015). Les capillaires fenestrés facilitent l'absorption efficace des petites molécules, telles que les acides aminés, les monosaccharides et les AGCC. Les vaisseaux lymphatiques jouent un rôle clé dans le transport des lipides absorbés par les entérocytes, sous forme de chylomicrons, vers la circulation lymphatique, puis vers la circulation sanguine. Les vaisseaux chylifères transportent également les cellules immunitaires et participent à la réponse immunitaire contre les infections intestinales.

La musculaire muqueuse est une fine couche de muscle lisse située sous la *lamina propria*. Elle est impliquée dans la motilité locale de la muqueuse intestinale, facilitant ainsi le mélange des nutriments avec les sécrétions intestinales et le contact des aliments avec l'épithélium pour améliorer l'absorption. Cette couche musculaire fine joue également un rôle dans l'évacuation des cellules mortes et dans le maintien de l'architecture de la muqueuse.

La structure de la muqueuse intestinale, la composition et l'épaisseur du mucus varient selon la région du TGI (Di Vincenzo et al. 2023). Par exemple, contrairement à l'intestin grêle où la muqueuse présente des villosités, le côlon est dépourvu de villosités mais présente des cryptes plus profondes, où se trouvent de nombreuses cellules caliciformes qui produisent le mucus nécessaire à la lubrification du contenu fécal. Le mucus est ainsi plus épais dans le côlon, offrant une protection accrue contre les bactéries commensales abondantes.

L'épithélium de la muqueuse intestinale est constamment renouvelé par les cellules souches des cryptes de Lieberkühn, garantissant la régénération rapide des cellules endommagées ou mortes, maintenant ainsi l'intégrité de la BI (Rohr et al. 2020).

La BI, par sa structure multifonctionnelle, agit comme une barrière physique face aux pathogènes et les xénobiotiques tout en régulant l'absorption des nutriments et maintenant une communication dynamique avec le MI.

B. La barrière intestinale, une barrière multifonctionnelle

1. La BI, une structure protectrice, une barrière physique

La BI agit comme une ligne de défense contre les microorganismes pathogènes, tels que les bactéries, les virus et les parasites. L'épithélium intestinal, avec ses JS, empêche la pénétration de ces agents pathogènes dans la circulation sanguine. De plus, la couche de mucus recouvrant l'épithélium piège les microorganismes et les empêche d'adhérer aux cellules épithéliales. L'intégrité de la BI est assurée par un ensemble de structures comprenant les JS, les jonctions adhérentes et les desmosomes, tandis que la

communication intercellulaire est facilitée par les jonctions gap (Vancamelbeke and Vermeire 2017) (Fig. 4).

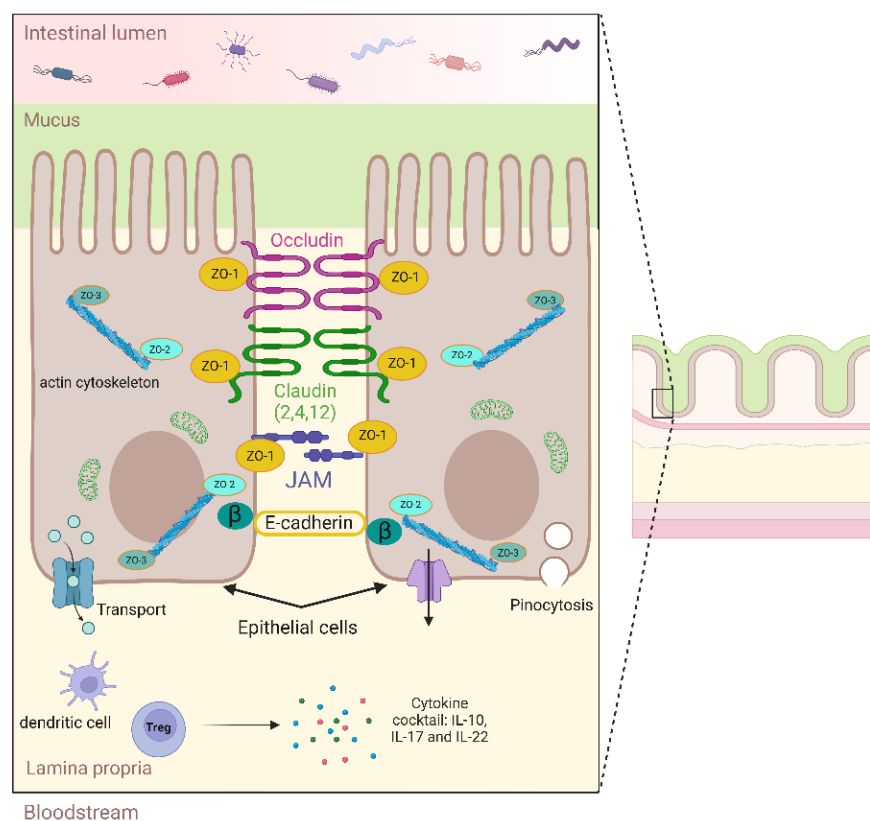


Figure 4: Barrière intestinale : barrière physique, immunitaire, de transport et de détoxification (Abou Diwan et al. 2023).

Les protéines de transport et de jonction présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules constituant la BI déterminent la perméabilité de cette dernière. Parmi ces jonctions, les JS, situées dans la région apicale de la BI, jouent un rôle primordial dans le maintien de la perméabilité paracellulaire. Les JS sont composées de protéines transmembranaires, telles que l'occludine et les claudines (notamment les claudines 3 et 5), ainsi que de protéines intracellulaires comme la caténine. L'occludine, une protéine transmembranaire de 65 kDa, a été la première identifiée au sein des JS (Furuse et al., 1993). Sa localisation dépend de son état de phosphorylation : les formes moins phosphorylées sont réparties entre la membrane basolatérale, le cytoplasme et les JS, tandis que la forme la plus phosphorylée se concentre exclusivement au niveau des JS (Sakakibara et al., 1997). Le rôle de l'occludine réside principalement dans la régulation des JS plutôt que dans leur formation. Les claudines, dont le poids moléculaire varie entre 21 et 28 kDa, sont essentielles à la formation des JS et participent à la polarité cellulaire ainsi qu'au flux paracellulaire des ions (Krause et al., 2008). La famille des protéines Zonula Occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) joue un rôle d'ancrage, reliant l'occludine et les claudines au cytosquelette. Parmi elles, ZO-1, une guanylate kinase associée à la membrane, se distingue par un poids moléculaire de 220 kDa.

Les JS confèrent à la BI une étanchéité lui permettant de réguler l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau, tout en empêchant le passage des substances nocives. Cette perméabilité sélective est cruciale pour maintenir l'équilibre entre l'absorption des éléments bénéfiques et la protection contre les éléments potentiellement dangereux. De plus, la BI joue un rôle important dans la signalisation immunitaire et l'inflammation, contribuant ainsi à la régulation de la réponse immunitaire systémique.

2. La BI, une barrière de transport

Tout en empêchant le passage des substances nocives, la BI joue un rôle crucial dans l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau. Cette perméabilité sélective est cruciale pour maintenir l'équilibre entre l'absorption des éléments bénéfiques et la protection contre les éléments potentiellement dangereux. Les cellules épithéliales spécialisées, telles que les entérocytes, sont responsables de l'absorption des nutriments digérés dans la lumière intestinale. Cette absorption est finement régulée pour garantir que les nutriments nécessaires sont efficacement absorbés tout en empêchant l'entrée de substances nocives. Le transport sélectif des diverses substances entre la lumière intestinale et la circulation systémique régule cette absorption. Ce transport peut se faire selon deux voies principales : la voie paracellulaire (entre les cellules épithéliales) et la voie transcellulaire (traversant les cellules épithéliales) (Lee et al. 2018).

D'une part, le transport paracellulaire implique le passage de substances à travers les espaces entre les cellules épithéliales, régulé par les JS (Vancamelbeke and Vermeire 2017). Sous des conditions physiologiques, cette voie permet le passage de petites molécules hydrosolubles et d'ions, comme le sodium ou le calcium, mais elle empêche le passage de macromolécules potentiellement dangereuses.

D'autre part, le transport transcellulaire concerne principalement les nutriments, les vitamines, les électrolytes et l'eau. Ce transport est assuré par des mécanismes actifs et passifs au sein des cellules épithéliales tels que : la diffusion passive, le transport actif, l'endocytose et la transcytose (**Fig. 4**) (Ma et al. 2018). Certaines petites molécules lipophiles, comme les acides gras ou les vitamines liposolubles, traversent librement la membrane cellulaire par diffusion simple. D'autres substances, telles que les ions, les acides aminés et les sucres, nécessitent des transporteurs spécifiques et des pompes dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) pour être absorbées activement contre leur gradient de concentration. Par exemple, le transporteur sodium-glucose (SGLT1) permet l'absorption active du glucose dans l'intestin grêle (Schoultz and Keita 2020). Certaines macromolécules, comme les immunoglobulines ou les antigènes alimentaires, peuvent être capturées par endocytose et transportées à travers la cellule épithéliale par transcytose. Ce mécanisme est également impliqué dans la présentation des antigènes aux cellules immunitaires sous-jacentes, jouant ainsi un rôle crucial dans la réponse immunitaire intestinale. En effet, si un passage d'agents pathogènes a lieu, les cellules immunitaires qui se trouvent

dans une couche de tissu conjonctif sous l'épithélium de la BI jouent un rôle clé dans la détection et l'élimination des agents pathogènes.

3. La BI, une barrière immunitaire

La BI joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie immunitaire. Sous la couche épithéliale, se situe un système immunitaire associé à la muqueuse. Ce système comprend des cellules immunitaires résidentes, telles que les macrophages, les lymphocytes T et B, et les cellules dendritiques (**Fig. 4**), ainsi que des structures lymphoïdes spécialisées, comme les plaques de Peyer. Au sein de ces plaques, se trouvent les cellules M (microfold cells) facilitant la présentation d'antigènes en capturant les particules de la lumière intestinale pour les transmettre aux cellules dendritiques (Vancamelbeke and Vermeire 2017). Ces cellules immunitaires maintiennent une surveillance constante, reconnaissant et répondant aux antigènes d'origine alimentaire, aux pathogènes et aux molécules microbiennes. Elles assurent ainsi un équilibre entre tolérance et immunité, permettant à l'intestin de coexister avec son microbiote. En effet, les cellules immunitaires de la BI expriment des récepteurs Toll-like (TLR) et d'autres molécules de reconnaissance des pathogènes, permettant de détecter et de répondre aux infections potentielles (Rohr et al. 2020). Les TLR détectent les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les motifs moléculaires associés aux dommages (DAMP) (Li and Wu 2021; Di Vincenzo et al. 2023). Ces récepteurs permettent aux entérocytes de détecter rapidement la présence de pathogènes (comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram -, reconnu par le TLR4 ou le peptidoglycane des bactéries Gram + reconnu par le TLR2) ou de signaux de stress cellulaire, déclenchant ainsi des réponses immunitaires appropriées (Tang et al. 2017; Rohr et al. 2020).

Les cellules immunitaires de la BI sont ainsi en communication constante avec le MI, ce qui permet une réponse immunitaire rapide et efficace. De plus, la BI produit des molécules antimicrobiennes, telles que les défensines, les lysozymes et les phospholipases A2, qui aident à contrôler la population microbienne (Condette et al. 2014).

Les cellules épithéliales et les cellules immunitaires de la BI produisent également des cytokines et des chimiokines qui modulent la réponse inflammatoire locale.

En maintenant une perméabilité sélective, la BI contribue à la régulation de la réponse inflammatoire afin de prévenir l'inflammation. Elle empêche les antigènes et les toxines de pénétrer dans la circulation sanguine, ce qui réduit le risque d'inflammation systémique.

4. La BI, une barrière de détoxification

Comme certains xénobiotiques lipophiles peuvent traverser la BI malgré son étanchéité, cette barrière assure la détoxification de ces substances nocives ingérées. Les cellules épithéliales possèdent des enzymes capables de métaboliser et de neutraliser les toxines avant qu'elles ne pénètrent dans la circulation sanguine. Cette fonction de détoxification est cruciale pour protéger l'organisme contre les

effets néfastes des toxines alimentaires et environnementales. Ces enzymes, telles que les cytochromes P450 (CYP), les glutathion S-transférases et les UDP-glucuronosyltransférases, sont essentielles pour la biotransformation des substances toxiques en composés moins nocifs qui peuvent être excrétés par l'organisme (Kaur 2018).

La BI intervient également dans la dégradation des composés chimiques. Les enzymes présentes dans la BI dégradent divers composés chimiques, y compris les pesticides et les polluants environnementaux (Suriyo et al. 2015). Par exemple, les enzymes de la famille des estérases hydrolysent les esters chimiques en acides et alcools, qui sont ensuite plus facilement éliminés par l'organisme. De plus, les CYP jouent un rôle clé dans la détoxification, où ils oxydent les toxines lipophiles pour les rendre plus hydrophiles. Cela permet leur excrétion par les reins ou le foie (Fan 2017).

En outre, les Glutathion S-transférases (GST) sont impliquées dans la phase II de la détoxification (Kaur 2018). Elles conjuguent le glutathion aux toxines, ce qui les rend plus solubles dans l'eau et facilite leur excrétion.

D'autres enzymes que nous appelons pompes d'efflux jouent un rôle crucial dans la fonction de détoxification de la BI (Chedik et al. 2018). Elles sont responsables de l'expulsion des substances toxiques et des xénobiotiques hors des cellules épithéliales intestinales vers la lumière intestinale, empêchant ainsi leur accumulation dans l'organisme. En éliminant les métabolites toxiques et les produits de dégradation, les pompes d'efflux aident à maintenir l'homéostasie cellulaire et à prévenir les dommages cellulaires. Ces pompes fonctionnent en utilisant l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement les substrats hors des cellules (Bieczynski et al. 2021).

Parmi les différentes pompes d'efflux, la P-glycoprotéine (P-gp) est la plus étudiée (Veszeka et al. 2018). Elle est exprimée à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales et expulse une large gamme de substrats, y compris des médicaments, des toxines et des métabolites, vers la lumière intestinale, empêchant ainsi leur accumulation dans l'organisme (Bieczynski et al. 2021). Cette pompe joue un rôle clé dans la protection de l'organisme contre les substances nocives en limitant leur absorption systémique.

Les Protéines de résistance aux médicaments multiples (MRP) font partie d'une famille de transporteurs d'efflux qui participent également à la détoxification. Elles transportent des anions organiques, des métabolites conjugués et des médicaments hors des cellules. Les MRPs sont impliquées dans la protection contre les toxines environnementales et les produits de dégradation des médicaments. La Protéine de résistance au cancer du sein (BCRP), par exemple, est une pompe d'efflux importante présente dans l'intestin (Veszeka et al. 2018). Elle expulse divers substrats, y compris des médicaments anticancéreux, des toxines et des produits de dégradation¹. La BCRP contribue à la limitation de l'absorption intestinale des substances nocives et à la protection de l'organisme.

5. La BI, une interface de communication avec le microbiote

La BI joue un rôle crucial en tant qu'interface de communication bidirectionnelle avec le MI. Cette relation symbiotique est essentielle au maintien de l'homéostasie intestinale et systémique. Les bactéries bénéfiques du MI, telles que les espèces commensales, participent activement au renforcement de la BI en stimulant la production de mucus par les cellules caliciformes et en modulant la réponse immunitaire locale. En retour, la BI fournit un environnement physiquement protégé, stable et nutritif qui favorise la croissance et la diversité du microbiote, garantissant ainsi une relation symbiotique durable.

Cette interaction dynamique entre la BI et le MI est indispensable pour maintenir l'intégrité de la barrière intestinale et, par conséquent, la santé globale de l'hôte. Par exemple, l'indole, un métabolite dérivé du tryptophane produit par *E. coli* et d'autres bactéries du MI, agit comme un signal chimique clé dans cette communication. Il contribue à la régulation de la perméabilité intestinale en renforçant les JS entre les cellules épithéliales de l'intestin (Thèse, Jaglin 2013). Ce processus réduit ainsi la perméabilité intestinale face aux toxines et aux agents pathogènes, prévenant l'entrée de substances nocives dans la circulation systémique et réduisant le risque d'inflammation chronique. En outre, l'indole participe à l'homéostasie intestinale en modulant l'équilibre entre l'immunité et la tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires et microbiens.

Cette tolérance immunitaire est également assurée, dans des conditions d'équilibre ou eubiose, par le récepteur TLR4 dont l'expression est modulée dans les entérocytes pour prévenir une réponse inflammatoire excessive face aux bactéries Gram-négatives du MI, qui produisent constamment du LPS (Tang et al. 2017).

En réponse à ces signaux microbiens, la BI ne se limite pas à une simple barrière physique. Les cellules entéroendocrines, un composant fondamental de cette barrière, jouent un rôle actif dans la communication entre l'intestin et d'autres systèmes de l'organisme. Elles sécrètent diverses hormones gastro-intestinales telles que la sérotonine, la cholécystokinine (CCK) et le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), qui influencent des fonctions intestinales clés comme la motilité, la digestion, l'absorption des nutriments et le métabolisme énergétique (Cryan et al. 2019). Ces hormones exercent également une action sur le système nerveux central (SNC) via l'axe intestin-cerveau, modifiant des processus cognitifs et émotionnels, et jouant un rôle dans des maladies neuropsychiatriques comme la dépression et l'anxiété.

En somme, la communication entre la BI et le MI est un processus hautement coordonné et bidirectionnel, impliquant des mécanismes chimiques, hormonaux et immunitaires. Cette synergie est non seulement cruciale pour la santé intestinale mais aussi pour l'équilibre général de l'organisme, ce qui souligne l'importance d'un microbiote équilibré pour la prévention des maladies métaboliques, immunitaires et neurologiques. *(La communication plus détaillée entre la BI et le MI via les différentes voies sera explorée dans le chapitre dédié à l'axe microbiote-intestin-cerveau.)*

Tout comme la BI, une autre barrière importante dans notre organisme est la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui joue un rôle crucial dans la protection du corps. Ces deux barrières présentent certaines similitudes en termes de transport sélectif et de la fonction de détoxification. Cependant, ces deux barrières se distinguent par leurs structures et leurs fonctions spécifiques. La BI, composée de cellules épithéliales reliées par des JS et recouverte de mucus, protège contre les agents pathogènes tout en permettant l'absorption des nutriments. En revanche, la BHE, formée de cellules endothéliales cérébraux (CEC) et renforcée par des péricytes et des astrocytes, régule strictement le passage des substances entre le sang et le cerveau pour maintenir un environnement stable pour les neurones. Bien que les deux barrières utilisent des JS pour maintenir leur intégrité, la BHE est beaucoup plus sélective en raison de la nécessité de protéger le cerveau des fluctuations chimiques. Ainsi, chaque barrière est parfaitement adaptée à son environnement unique et à ses fonctions spécifiques, illustrant la complexité et l'efficacité des mécanismes de protection de l'organisme.

Chapitre III : La barrière hémato-encéphalique

A. Les barrières du système nerveux central : l'importance de la BHE

Le SNC est protégé par plusieurs barrières physiologiques qui maintiennent son environnement interne stable et protégé. Trois barrières principales régulent et limitent les échanges d'ions, de molécules et de cellules entre le sang et le SNC. La première est la BHE, située au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral (Daneman and Prat 2015). La deuxième est la barrière sang-liquide céphalo-rachidien (LCS), localisée au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes, qui sont responsables de la sécrétion du LCS (Saunders et al. 2016; Kadry et al. 2020). Celle-ci régule la production et la composition du LCS. Enfin, la troisième barrière se trouve au niveau de l'arachnoïde, la couche intermédiaire des méninges, par laquelle le LCS est drainé vers les sinus veineux de la dure-mère (Fame and Lehtinen 2020). Parmi celles-ci, la BHE joue un rôle crucial dans la protection du cerveau. Sa découverte remonte à la fin du XIXe siècle. En 1885, le physiologiste allemand Paul Ehrlich a mené des expériences en injectant des colorants dans la circulation sanguine d'animaux (Ehrlich 1885; Saunders et al. 2016). Il a observé que ces colorants teintaient tous les organes sauf le cerveau et la moelle épinière, ce qui l'a conduit à conclure que le cerveau possédait une barrière spéciale. Cependant, Ehrlich a initialement mal interprété ses résultats, pensant que les colorants ne pouvaient pas pénétrer les tissus nerveux en raison de leur nature particulière.

Ce n'est qu'en 1913 qu'Edwin Goldman, un étudiant d'Ehrlich, a confirmé l'existence de cette barrière en injectant des colorants directement dans le liquide céphalo-rachidien (Goldmann 1913; Saunders et al. 2016). Il a constaté que cette fois, le cerveau et la moelle épinière étaient colorés, mais pas les autres organes. Ces expériences ont établi les bases du concept de la BHE, bien que sa structure et son fonctionnement détaillés n'aient été pleinement compris qu'à partir des années 1960, grâce aux avancées de la microscopie électronique.

La BHE est maintenant reconnue comme une barrière physiologique essentielle, hautement sélective, composée principalement de cellules endothéliales cérébrales (CEC) reliées par des JS, qui régulent strictement le passage des substances entre le sang et le cerveau (Abbott et al. 2010; Zhao et al. 2015). Elle protège le cerveau des agents pathogènes, des toxines, et des variations hormonales et ioniques, tout en permettant l'apport de nutriments essentiels (Obermeier et al. 2013). La BHE assure cet apport grâce à sa vaste surface d'échange qui pourrait s'étendre jusqu'à 18 m², et fait de cette barrière vasculaire la principale voie d'entrée du SNC (Abbott et al. 2010; Gosselet 2017). Elle est, de plus, plus sélective et efficace dans la régulation du passage des xénobiotiques que les 2 autres barrières qui n'ont pas de rôle métabolique pour dégrader ou modifier les substances avant qu'elles n'atteignent le cerveau et ne possèdent pas les mêmes capacités immunitaires spécifiques que la BHE, comme l'expression des TLR (Netea et al. 2017; Logsdon et al. 2018). De plus, la BHE est unique par sa sélectivité stricte, son rôle immunitaire spécialisé, sa capacité à maintenir l'homéostasie cérébrale, et sa fonction métabolique, ce qui la rend essentielle pour la protection et le bon fonctionnement du cerveau (Gosselet 2017).

B. L'embryogenèse : mise en place de l'architecture cellulaire de la BHE fœtale à la BHE adulte

L'architecture cellulaire de la BHE est principalement composée de CEC, de péricytes, d'astrocytes et de la matrice extracellulaire (MEC), chacun contribuant de manière spécifique à la fonction de barrière. Les CEC forment la couche principale de la BHE. La matrice extracellulaire de la BHE, composée de protéines telles que le collagène, la laminine et la fibronectine, fournit un support structural aux CEC et péricytes (Knox et al. 2022). Elle participe également à la signalisation cellulaire et à la modulation de la perméabilité de la BHE. Avec la microglie, les neurones et la matrice extracellulaire, la BHE constitue l'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV) (Fig. 5) (de Aquino et al. 2019; Saint-Pol et al. 2020).

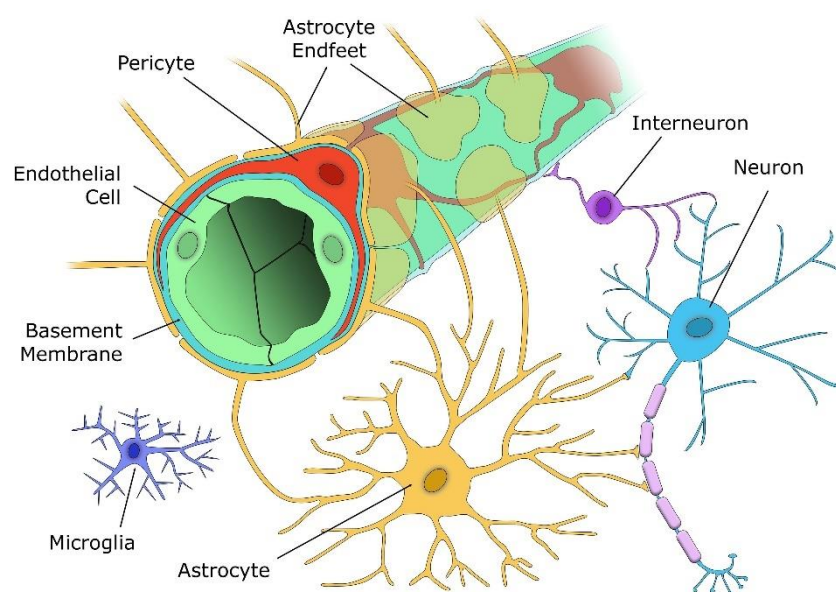


Figure 5: Les composants cellulaires de l'UNGV (Brown et al. 2019).

La formation du système vasculaire cérébral commence autour de la cinquième semaine de grossesse, soit environ trois semaines après la fécondation. Ce n'est qu'à la huitième semaine que la vascularisation du cerveau devient plus complexe avec le développement d'un réseau vasculaire plus mature et plus ramifié, qui continue à se développer tout au long du deuxième et du troisième trimestre. Vers la fin du premier trimestre (8-12 semaines), les premiers signes de la formation de la BHE apparaissent (Marín-Padilla 2012). À ce stade, les CEC commencent à se différencier sous l'influence de signaux moléculaires spécifiques, tels que les facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (VEGF) et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP). Ces CEC commencent à développer des JS, principalement composées de protéines telles que les claudines (1, 3, 5 et 12 ; la claudine 5 étant la plus exprimée), l'occludine et les cadhérines, qui réduisent la perméabilité paracellulaire et forment ainsi une barrière initiale. Ces protéines sont liées au cytosquelette de la cellule par des protéines cytoplasmiques dites Zonula occludens (ZO-1 et ZO-2) (Gosselet et al. 2013; Gosselet 2017).

Au cours du deuxième trimestre, la BHE continue de se développer et se renforce. Les JS se perfectionnent, et d'autres éléments protecteurs, comme les péricytes et les astrocytes (types de cellules gliales qui soutiennent la fonction de la BHE), commencent à s'associer aux CEC pour assurer une meilleure protection et régulation des échanges entre le sang et le cerveau (Daneman and Prat 2015; Thèse, Deligne 2020). La BHE présente une perméabilité relativement élevée, permettant le passage de molécules nécessaires au développement cérébral. Cependant, à mesure que le fœtus se développe, la BHE subit des modifications structurelles et fonctionnelles significatives. Les JS deviennent plus complexes et plus efficaces, réduisant progressivement la perméabilité de la barrière (Obermeier et al. 2013). Les astrocytes jouent un rôle crucial dans cette maturation en libérant des facteurs trophiques, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), qui renforcent les JS et améliorent la fonction de barrière des CEC (Daneman et al. 2010; Knox et al. 2022). Les péricytes, situés autour des CEC, sont en contact étroit avec celles-ci, partageant la même membrane basale (de Aquino et al. 2019). Ces cellules contribuent également à la régulation de la perméabilité et à la stabilité de la BHE. Ils interagissent avec les cellules endothéliales via des voies de signalisation, telles que la voie Notch et la voie du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), pour moduler la formation des JS et la fonction de barrière (Versele et al. 2022; Menaceur et al. 2023).

Bien que la BHE soit fonctionnelle et adaptée à l'environnement fœtal avant la naissance, durant le troisième trimestre, elle continue à se renforcer et à se spécialiser après la naissance (Saunders et al. 2012). La maturité complète de la BHE est atteinte peu après la naissance, garantissant ainsi une protection plus optimale du cerveau contre les toxines et les agents pathogènes circulants. À la naissance, la BHE est déjà bien formée et fonctionnelle, mais elle continue de se développer et de se renforcer pendant les premières années de la vie (Engelhardt and Liebner 2014). Vers l'âge de 6 mois à 1 an, la BHE est beaucoup plus mature. Les JS entre les CEC deviennent plus complexes et efficaces, et les cellules gliales renforcent la barrière. À ce stade, la perméabilité diminue et la sélectivité de la barrière est plus proche de celle observée chez l'adulte. C'est vers l'âge de 2 à 3 ans que la BHE atteint sa perméabilité minimale et sa sélectivité maximale (Engelhardt and Liebner 2014; Quigley 2019).

Cela veut dire que durant la période périnatale qui englobe la grossesse et les 1000 premiers jours de vie de l'enfant, la BHE n'est pas encore pleinement développée et optimale, ce qui rend le fœtus et ensuite le nouveau-né particulièrement vulnérable aux expositions environnementales. Cette vulnérabilité souligne l'importance de minimiser l'exposition aux substances nocives durant cette période critique de croissance pour assurer un développement cérébral sain et optimal tout en diminuant le risque de maladies neurologiques à long terme.

C. Fonctions de la BHE

1. La BHE, une barrière physique sélective et spécialisée

Les CEC possèdent des propriétés structurales et métaboliques distinctes qui les différencient de celles présentes dans les autres organes (**Fig. 6**) (Profaci et al. 2020). En effet, les CEC sont dotées d'un mélange complexe de protéoglycanes et de glycoprotéines chargées négativement, qu'on appelle glycocalyx, recouvrant la surface luminale des CEC (Alphonsus and Rodseth 2014; Zhang et al. 2022). C'est un élément clé qui participe à la restriction de la perméabilité vasculaire de la BHE en contrôlant l'accès de molécules anioniques à la membrane plasmique endothéliale (Kutuzov et al. 2018). De plus, les CEC composant la BHE sont plus étanches que les cellules endothéliales des vaisseaux périphériques du corps. Cette étanchéité est assurée par les JS surtout, mais aussi les jonctions adhérentes (**Fig. 6 B**). Les jonctions adhérentes participent à l'adhésion cellule-cellule et le premier contact entre cellules endothéliales adjacentes, et vont permettre la formation des JS (Thèse, Deligne 2020). Grâce aux JS reliant ses CEC, la BHE agit comme une barrière physique sélective.

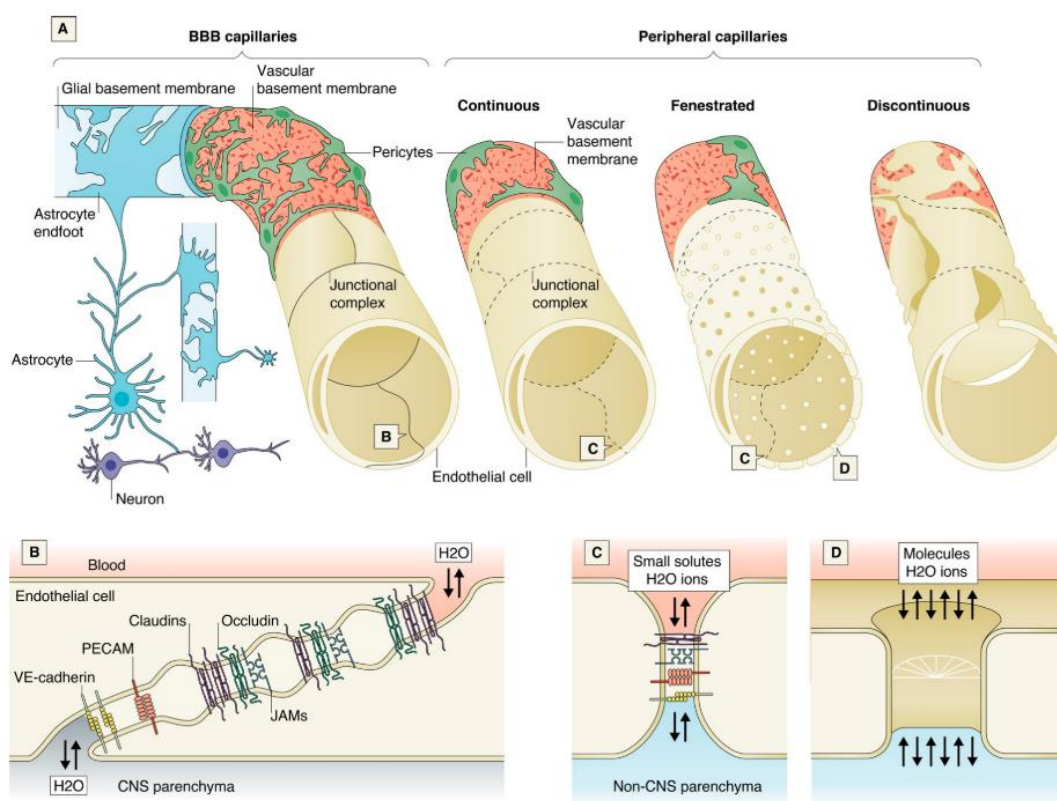


Figure 6 : Les différences entre les cellules endothéliales cérébrales (CEC) et les cellules endothéliales périphériques en termes de (A) structure des microvaisseaux (pas de fenestrations dans les CEC), Plus d'étanchéité (dans les CEC dans (B) que dans les cellules périphériques dans (C)) assurée par les jonctions serrées et (D) schématisation des fenestrations trouvées dans les cellules endothéliales périphériques (Profaci et al. 2020).

Si les claudines interviennent dans l'installation de ces jonctions, l'occludine est plutôt impliquée dans leur régulation. Ces jonctions créent une barrière imperméable aux molécules hydrophiles et aux ions, empêchant le passage paracellulaire (passage des molécules à travers les JS) non contrôlé et assurant

ainsi une protection efficace du tissu cérébral (**Fig. 6 C**). De plus, afin de limiter les échanges par la voie transcellulaire, les CEC se caractérisent par une faible quantité de vésicules d'endocytose et de pinocytose et l'absence de canaux transendothéliaux et fenestrations entre les cellules (**Fig. 6 A et C**) (Gosselet et al. 2014; Profaci et al. 2020).

A la différence des cellules endothéliales des vaisseaux périphériques du corps, les CEC sont dotées d'une plus grande densité de mitochondries (Oldendorf et al. 1977). Ces organites énergétiques assurent les processus métaboliques essentiels pour fournir les substrats nécessaires à la production d'énergie et à la synthèse de biomolécules importantes pour la fonction de barrière. Cette abondance en mitochondries est essentielle pour assurer un apport élevé en ATP pour le transport actif et le métabolisme, deux fonctions clés de la BHE.

2. Le transport médié par la BHE

En plus de sa fonction de barrière physique, la BHE possède des mécanismes de transport sélectif qui permettent le passage de nutriments essentiels et de molécules nécessaires au fonctionnement cérébral. Le transport médié par la BHE est un processus hautement régulé et spécialisé. Ce transport repose sur plusieurs mécanismes spécialisés, incluant le transport passif, la transcytose et le transport actif (**Fig. 7**) (Saint-Pol et al. 2020).

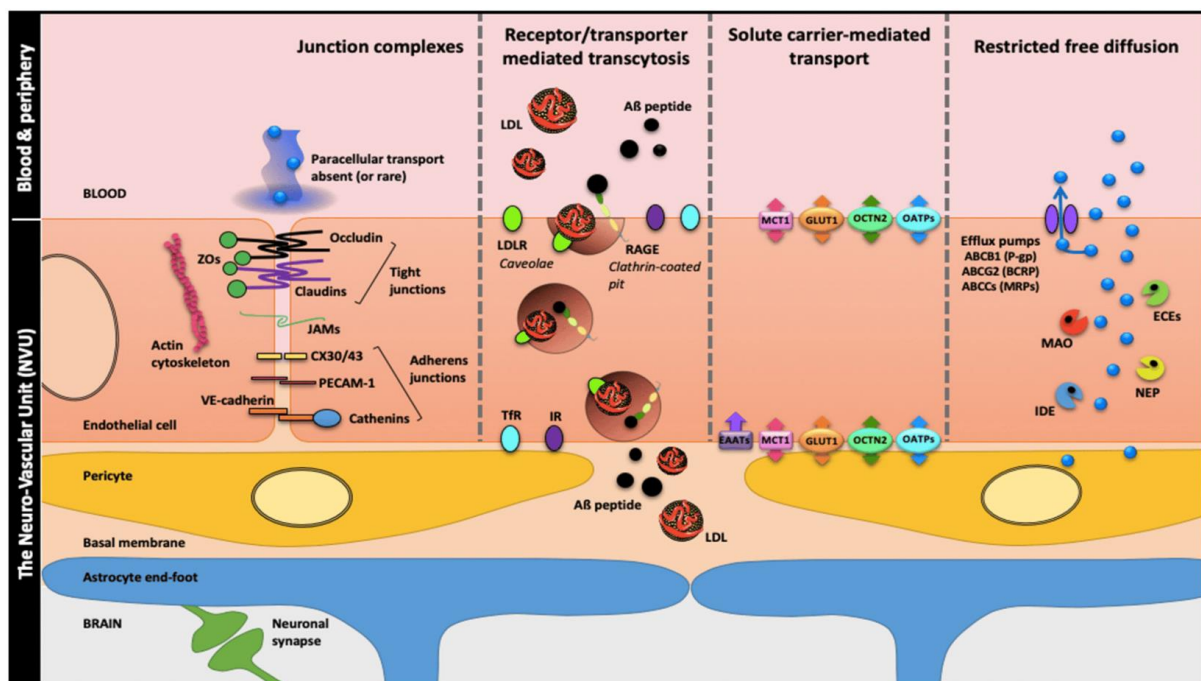


Figure 7: La barrière hémato-encéphalique est une barrière physique dotée de : jonctions serrées (permettant un passage paracellulaire sélectif), vésicules de transcytose, de pompes d'efflux et de transporteurs actifs (Saint-Pol et al. 2020).

Le transport passif à travers la BHE se fait par diffusion simple ou facilitée, permettant le passage des molécules lipophiles et de certaines petites molécules hydrophiles. Ce mécanisme ne nécessite pas d'énergie et dépend du gradient de concentration des substances. Les molécules lipophiles, telles que les gaz (O₂, CO₂) et certaines hormones stéroïdiennes, peuvent traverser librement la membrane

cellulaire des CEC. Selon leur nature et leur taille, certaines molécules peuvent franchir la BHE par voie paracellulaire. Quelques-unes peuvent diffuser librement (diffusion passive) mais la plupart doivent emprunter des protéines de transport ou les vésicules de transcytose

La transcytose est un processus par lequel les macromolécules et les complexes protéiques sont transportés à travers les CEC par endocytose et exocytose (Saint-Pol et al. 2020). Il existe deux types principaux de transcytose :

- **Transcytose récepteur-dépendante** : Ce mécanisme implique des récepteurs spécifiques sur la surface des CEC qui lient les ligands, tels que les lipoprotéines et les protéines de transport du fer (transferrine), et les transportent à travers la cellule.
- **Transcytose adsorptive** : Ce mécanisme repose sur des interactions électrostatiques entre les macromolécules chargées positivement et la surface cellulaire négativement chargée, permettant leur internalisation et transport.

Quand des transporteurs spécifiques interviennent, tels que le transporteur de glucose GLUT1, les transporteurs d'acides aminés, et les pompes d'efflux (transporteurs ABC : ATP-Binding Cassette), on parle de transport actif (Versele et al. 2020, 2022). Ces transporteurs utilisent l'énergie dérivée de l'ATP pour déplacer les substances contre leur gradient de concentration. Les transporteurs de glucose GLUT1 sont essentiels pour l'apport énergétique du cerveau, en facilitant l'entrée du glucose, principal substrat énergétique des neurones. Les transporteurs ou pompes d'efflux, tels que la P-gp retrouvée également au niveau de la BI, expulsent activement les substances toxiques et les médicaments hors du cerveau, contribuant ainsi à la protection du SNC (Gosset et al. 2021). Les transporteurs d'acides aminés, quant à eux, permettent l'entrée des acides aminés nécessaires à la synthèse protéique et aux fonctions métaboliques du cerveau (Zaragoza 2020).

3. Le rôle métabolique de la BHE

La BHE joue également, comme la BI, un rôle métabolique important dans le maintien de l'homéostasie du SNC. En plus de sa fonction de barrière physique sélective et de transport, la BHE est impliquée dans divers processus métaboliques qui sont essentiels pour la protection et le fonctionnement optimal du cerveau (Zhang et al. 2022). Les enzymes présentes dans les CEC dégradent et modifient certaines substances avant leur passage dans le cerveau, contribuant ainsi à la détoxification et à la protection contre les agents neurotoxiques. De plus, la BHE participe à la régulation du microenvironnement cérébral en maintenant des concentrations spécifiques d'ions et de neurotransmetteurs, essentielles pour la transmission synaptique et l'excitabilité neuronale.

Les CEC de la BHE participent également au métabolisme des neurotransmetteurs. Elles expriment des enzymes telles que la monoamine oxydase (MAO) et la catéchol-O-méthyltransférase (COMT), qui dégradent les neurotransmetteurs monoaminergiques comme la dopamine, la noradrénaline et la

sérotonine (Zhang et al. 2022). Cette régulation enzymatique est cruciale pour maintenir les niveaux appropriés de neurotransmetteurs dans le cerveau et prévenir la neurotoxicité.

De plus, d'autres enzymes telles que les CYP, sont impliquées dans la dégradation et la détoxification des xénobiotiques, y compris les médicaments et les toxines environnementales (Zhang et al. 2022). Ces enzymes métabolisent les substances lipophiles en métabolites plus hydrophiles, facilitant leur élimination du cerveau. En parallèle aux cytochromes, les pompes d'efflux P-gp et BCRP déjà décrites dans les parties précédentes, agissent non seulement comme des transporteurs au niveau de la BI et de la BHE mais aussi comme des enzymes de détoxification (Zhang et al. 2022). Ces pompes interviennent dans l'absorption, la distribution, le métabolisme, la sécrétion et la toxicité des xénobiotiques. Des études récentes indiquent que l'expression de ces pompes serait influencée par le MI (Bieczynski et al. 2021). Ce processus de détoxification qui dépend d'une multitude de facteurs est essentiel pour protéger le SNC des effets neurotoxiques des substances exogènes.

4. La fonction immunitaire de la BHE

En plus de ses fonctions de barrière physique et métabolique, la BHE est activement impliquée dans la surveillance immunitaire et la réponse aux infections (Chen and Li 2020). Cette fonction immunitaire est cruciale pour prévenir les inflammations et les dommages neuronaux.

Comme la BI, la BHE possède une fonction immunitaire spécialisée permettant une surveillance immunitaire. Les CEC expriment des récepteurs TLR et d'autres molécules de reconnaissance des pathogènes, permettant de détecter et de répondre aux infections potentielles (Mou et al. 2022). Les TLR détectent les DAMP (Netea et al. 2017; Li and Wu 2021). Ces récepteurs permettent aux CEC de détecter rapidement la présence de pathogènes dans le sang (comme le LPS des bactéries Gram -) ou de signaux de stress cellulaire, déclenchant ainsi des réponses immunitaires appropriées (comme la voie du Nuclear Factor kappa B : NF- κ B) (Long et al. 2021).

En réponse à la détection de pathogènes ou de signaux de stress, les CEC de la BHE peuvent produire et sécréter diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine-6 (IL-6) (Varatharaj and Galea 2017; Galea 2021). Ces molécules signalent aux cellules immunitaires périphériques de migrer vers le site de l'infection ou de l'inflammation, renforçant ainsi la réponse immunitaire locale. Les CEC de la BHE peuvent aussi moduler l'activité des cellules immunitaires en produisant des molécules immunosuppressives, telles que le TGF- β et l'interleukine-10 (IL-10). Ces molécules aident à maintenir un équilibre entre l'activation immunitaire nécessaire pour combattre les infections et la suppression des réponses immunitaires excessives qui pourraient endommager le tissu neuronal.

La BHE régule, de plus, le passage des cellules immunitaires entre le sang et le SNC. Les CEC expriment des molécules d'adhésion, telles que les molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM) et les

molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM), qui facilitent l'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers la BHE (Versele et al. 2022).

La BHE agit également comme une barrière immunitaire en limitant l'accès des cellules immunitaires périphériques au SNC. Cette fonction est essentielle pour prévenir les réactions auto-immunes et protéger le tissu neuronal des dommages inflammatoires (Dinan and Cryan 2017).

La BHE n'est pas une barrière isolée, elle est étroitement liée à la BI et le MI. Ensemble, ces trois éléments forment un réseau complexe et interconnecté de communication bidirectionnelle, que l'on appelle l'axe microbiote-intestin-cerveau (AMIC). L'homéostasie au sein de cet axe dépend donc de celle de chacune de ces composantes.

Chapitre IV : L'axe microbiote-intestin-cerveau

A. Homéostasie de l'axe microbiote-intestin-cerveau

L'axe microbiote-intestin-cerveau (AMIC) est un concept émergent qui illustre l'interaction bidirectionnelle complexe entre trois systèmes interdépendants : le SNC, le TGI, et le MI (Cryan et al. 2019). L'homéostasie de l'axe microbiote-intestin-cerveau représente un équilibre dynamique et crucial qui régule les interactions fonctionnelles entre ces trois systèmes (Suganya and Koo 2020). La communication bidirectionnelle entre le cerveau et l'intestin maintient cet équilibre grâce à une panoplie de mécanismes permettant une régulation coordonnée entre le cerveau et l'intestin (Banfi et al. 2021). L'AMIC ne se limite pas à des interactions locales dans l'intestin, mais exerce une influence majeure sur l'ensemble du corps : les fonctions cérébrales, le comportement et le métabolisme.

B. La communication bidirectionnelle au sein de l'axe et le rôle du microbiote

La communication bidirectionnelle au sein de cet axe est cruciale et débute dès le développement de l'embryon. En effet, le MI joue un rôle critique dans le développement du cerveau, notamment dans la maturation des circuits neuronaux et la plasticité synaptique (Collins et al. 2012). La modulation des fonctions cérébrales par le MI ne s'arrête pas au développement du cerveau durant l'embryogenèse mais se poursuit tout au long de la vie de l'individu (**Fig. 8**) (Cryan et al. 2019). Le maintien de l'homéostasie au sein de l'axe est donc essentiel non seulement pendant la grossesse et la période périnatale, mais aussi tout au long de la vie, jusqu'à l'âge adulte (Balaguer-Trias et al. 2022).

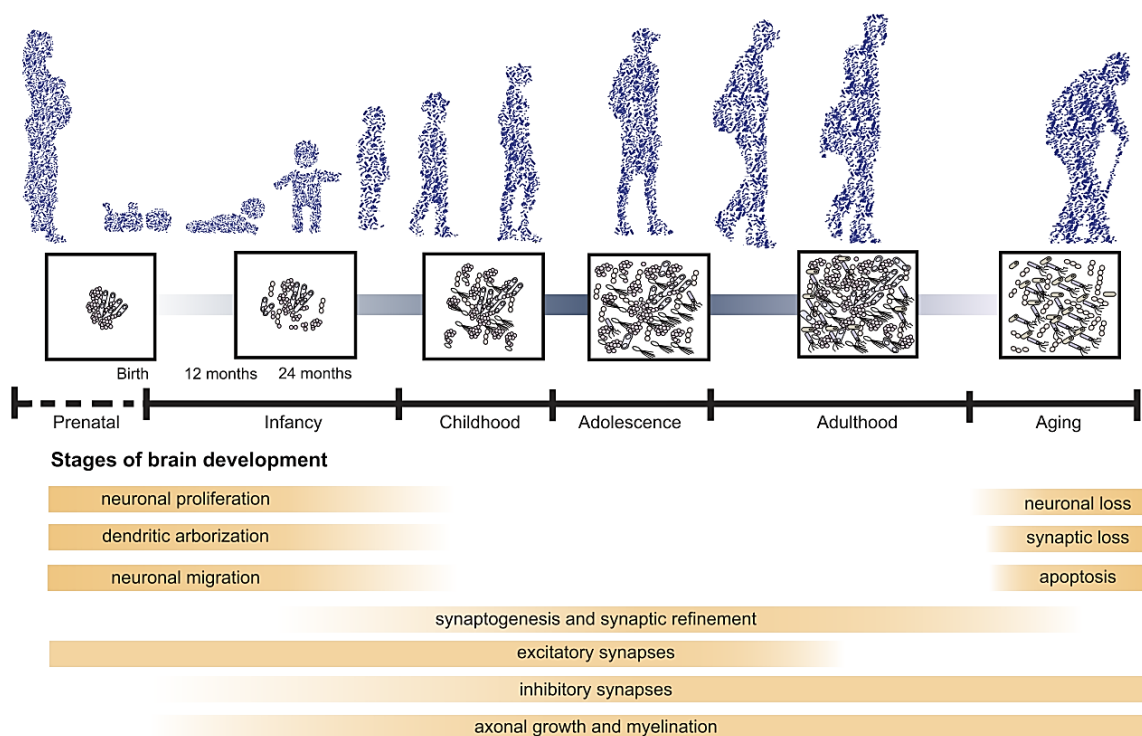


Figure 8: Graphique chronologique indiquant les changements dans la diversité microbienne au cours de la vie humaine, en parallèle aux stades de développement du cerveau (Cryan et al. 2019).

Le MI influence la neurogenèse, notamment dans l'hippocampe, une région clé pour la mémoire et l'apprentissage. Le butyrate qui fait partie des AGCC (*cf page 23*) produits par le MI favorisent la production de neurotrophines comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), essentiel à la plasticité synaptique (Cryan et al. 2019).

Comme déjà évoqué, il existe plusieurs systèmes de communication, notamment neuronale, hormonale, immunitaire et métabolique au sein de l'AMIC. Ces voies permettent de réguler de manière précise et dynamique des interactions entre le MI, l'intestin et le cerveau, orchestrant ainsi les fonctions cérébrales et intestinales (Appleton 2018).

La voie neuronale est assurée par le nerf vague et le système nerveux entérique (SNE). Le nerf vague constitue la principale voie de communication neuronale entre le tractus gastro-intestinal et le SNC (Cryan et al. 2019; Morais et al. 2021). En effet, grâce à ses fibres afférentes et efférentes, ce nerf lie le cerveau à l'intestin et permet la détection des molécules produites par les bactéries intestinales. Des signaux afférents provenant de l'intestin, transmis par des récepteurs sensoriels et chimiques présents dans la paroi intestinale, influencent directement l'activité cérébrale, notamment dans des régions comme le noyau du tractus solitaire et le système limbique. En retour, le SNC régule via le nerf vague des fonctions gastro-intestinales telles que la motilité et la sécrétion digestive. Outre son interaction avec le SNC, le SNE est un réseau neuronal autonome capable de réguler indépendamment plusieurs fonctions intestinales. Il communique avec le MI par des médiateurs chimiques et des neurotransmetteurs, comme la sérotonine, un neurotransmetteur dont 90 % est produit par les micro-organismes résidents dans l'intestin et qui influence les fonctions motrices et sensorielles de l'intestin, ainsi que l'humeur via ses effets sur le cerveau (Yano et al. 2015).

La voie hormonale, quant à elle, est médiée par des hormones telles que la ghréline, la CCK, le GLP-1 et le peptide YY (PYY) qui sont sécrétées par l'intestin (*cf page 31*) en réponse à des signaux du microbiote et influencent directement les fonctions cérébrales, notamment la régulation de l'appétit et du stress (Zheng et al. 2024). L'axe hypothalamo-pituitaire intervient dans cette voie (Morais et al. 2021). Il est responsable de la réponse au stress et est directement influencé par le MI. Un MI déséquilibré peut entraîner une activation excessive de cet axe, augmentant les niveaux de cortisol, une hormone de stress, ce qui peut altérer les fonctions cérébrales et intestinales (Cryan and Dinan 2012).

Comme décrit dans le chapitre 1, le MI régule la maturation et la fonction du système immunitaire en stimulant les cellules immunitaires intestinales, créant ainsi un réseau de voies immunitaires au sein de l'axe. Les cellules immunitaires intestinales, en réponse donc aux signaux microbiens, sécrètent des cytokines pro- ou anti-inflammatoires et des chimiokines qui peuvent influencer la perméabilité des barrières et la neuroinflammation (Rutsch et al. 2020). Les interactions entre le MI et le système immunitaire, sont essentielles pour maintenir l'homéostasie et prévenir les maladies inflammatoires et neurodégénératives. Si la régulation de ces voies de communication par le microbiote est possible, c'est

BHE (**Fig. 10**). Cela explique comment la santé neurologique (comportement, cognition, humeur) reflète la santé du MI (Appleton 2018; Rutsch et al. 2020). En

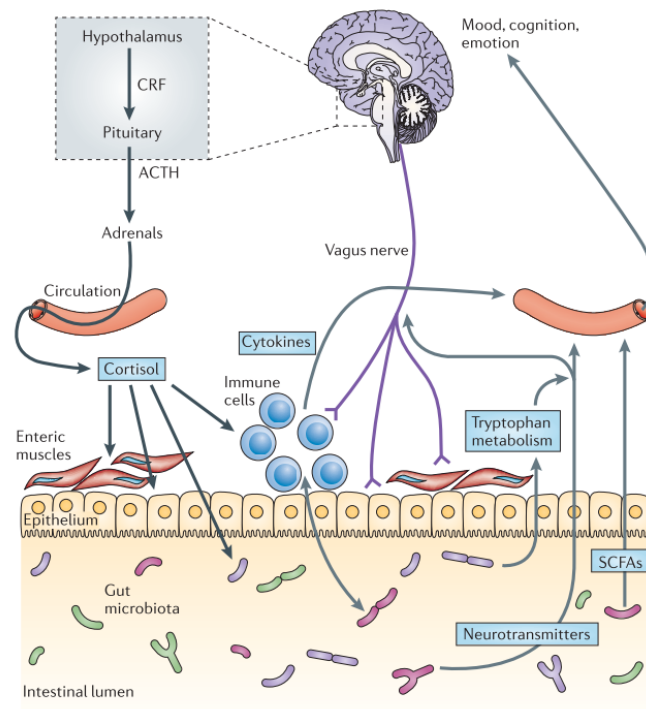


Figure 10: Implication de la communication multidirectionnelle entre le microbiote et le cerveau dans les fonctions neurologiques (Cryan and Dinan 2012). ACTH : adrenocorticotrophic hormone; CRF : corticotropin-releasing factor.

Il est devenu de plus en plus clair que les bactéries, par la production de ces molécules neuroactives, jouent un rôle direct dans la communication entre l'intestin et le cerveau. L'acétylcholine, le GABA et la sérotonine, sont produits par des bactéries des genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* et *Streptococcus*, peuvent influencer la physiologie des cellules cérébrales de manière directe et indirecte (Rutsch et al. 2020). 90 % de la sérotonine nécessaire à la régulation de l'humeur, du comportement, du sommeil et de plusieurs autres fonctions du SNC et du TGI est produite dans l'intestin à partir du tryptophane alimentaire (Cryan et al. 2019). *Clostridium perfringens* module la production intestinale de la 5-HT via la TPH1 elle-même modulée par les AGCC. La 5-HT active une variété de récepteurs sur les fibres nerveuses afférentes du TGI, jouant un rôle clé dans la régulation de nombreuses fonctions gastro-intestinales. Elle intervient notamment dans le péristaltisme intestinal, la sécrétion d'électrolytes, la perception de la douleur et les réponses inflammatoires. En effet, elle se lie aux récepteurs 5-HT des microglies et induit la libération d'exosomes contenant des cytokines, fournissant ainsi un mécanisme supplémentaire à l'inflammasome essentiel à la modulation de la neuroinflammation induite par l'intestin.

L'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3) est un complexe protéique intracellulaire qui joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée, protégeant la BHE et le cerveau (**Fig. 11**). Il est activé par des signaux pro-inflammatoires comme ceux induits par les

récepteurs TLR et peut être exprimé par les CEC et microgliales de la BHE (Rutsch et al. 2020). Une fois activé, le NLRP3 induit une cascade de signalisation commençant par l'activation de la caspase-1, qui conduit à la maturation des cytokines inflammatoires clés comme IL-1 β et IL-18, et peut déclencher un processus de mort cellulaire inflammatoire appelé pyroptose (Fig. 11).

Un autre métabolite microbien influençant l'activité des microglies est le tryptophane, le précurseur de la sérotonine. Les métabolites bactériens dérivés du tryptophane alimentaire pourraient contrôler l'inflammation du SNC via un mécanisme médié par le récepteur des hydrocarbures aryliques (Ahr) (Fig. 11), agissant sur l'activation des microglies et le programme transcriptionnel des astrocytes.

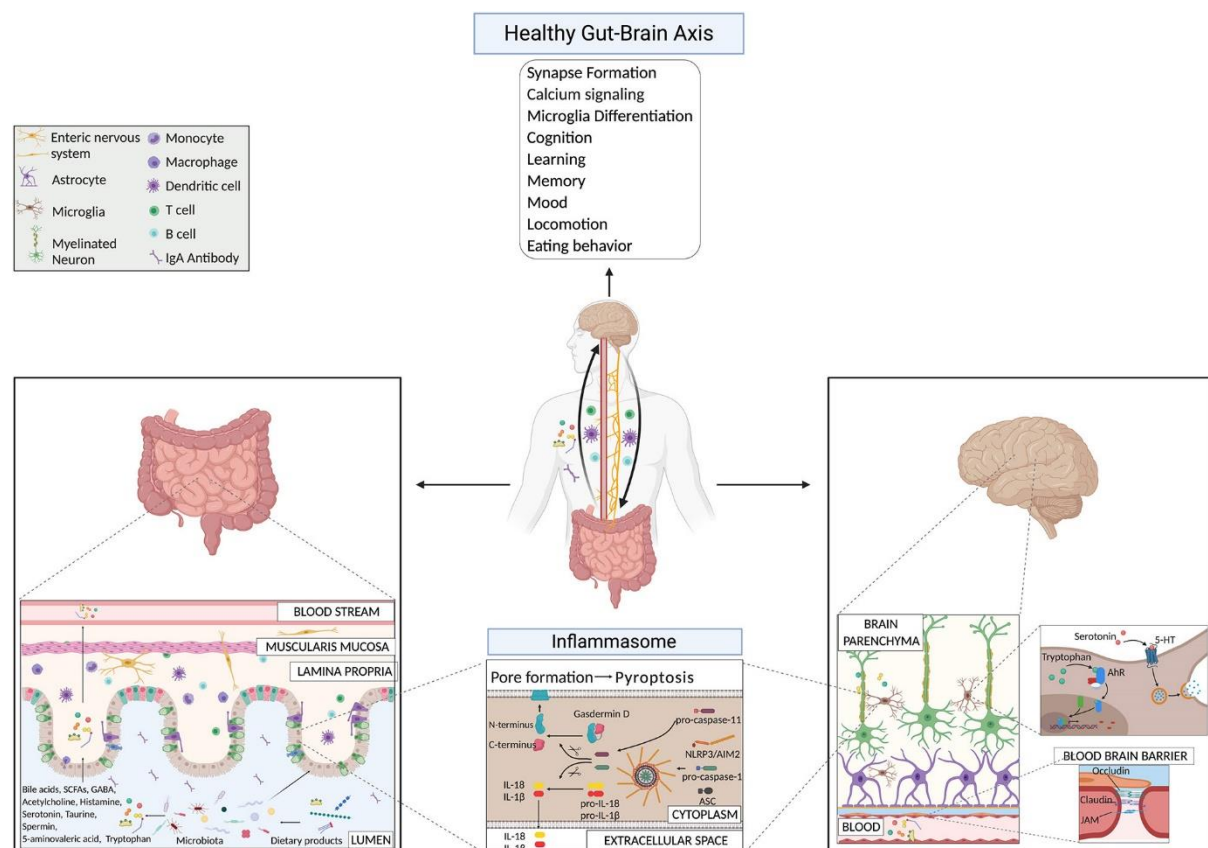


Figure 11: Mécanismes de communication par les métabolites bactériens et la voie de l'inflammasome au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans des conditions physiologiques (Rutsch et al. 2020).

Le tryptophane, peut également moduler l'activité de l'inflammasome. Le tryptophane et ses dérivés peuvent influencer la signalisation immunitaire et la neuroinflammation via des récepteurs spécifiques (Rutsch et al. 2020).

Afin de réguler cette réponse inflammatoire et éviter des dommages neuronaux associés à une inflammation chronique, les AGCC comme le butyrate modulent la production de ces molécules neuroactives et régulent la neuroinflammation et peut l'atténuer (Li et al. 2024). De ce fait, ce rôle neuroprotecteur des AGCC a été associé à une amélioration des comportements anxieux et dépressifs,

dans des modèles animaux de dépression. Concrètement, ces études ont montré que l'administration de *Clostridium butyricum* améliore les symptômes comportementaux par la production de butyrate qui stimule le GLP-1, réduisant les symptômes dépressifs (Sun et al. 2018).

La BHE assure son rôle de passage de ces métabolites et ces derniers, en retour, participent à l'amélioration de l'intégrité de la BHE et la modulation des fonctions cérébrales (Rutsch et al. 2020). Le MI, par ses interactions métaboliques, préserve alors la santé intestinale et cérébrale, soulignant l'importance de cette communication au sein de l'AMIC dans la régulation de l'inflammation et des maladies associées.

L'homéostasie au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau est essentielle pour le maintien d'un équilibre sain dans l'organisme. Comme déjà détaillé, cet équilibre dépend d'une interaction harmonieuse entre les composants de l'axe. Cela veut dire que la stabilité au sein de l'axe dépend donc de celle de chacun de ses composants. De ce fait, une perturbation qui dure au sein du MI entraînerait des conséquences significatives sur les barrières et par la suite le cerveau (Long-Smith et al. 2020). Ces perturbations peuvent être dues à une exposition chronique à des facteurs environnementaux tels que les pesticides, et entraînent des conséquences sur la santé à l'âge adulte surtout si celle-ci a lieu pendant une période critique de la vie : la période périnatale.

Chapitre V : Pesticides et contaminants alimentaires

A. Utilisation des pesticides : introduction à l'impact du Chlorpyrifos sur l'environnement et la santé

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les pesticides sont définis comme toute substance ou mélange de substances destinés à prévenir, détruire ou contrôler tout organisme nuisible, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, les espèces indésirables de plantes ou d'animaux, causant des dommages ou interférant avec les activités humaines (production, transformation, stockage, transport, commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, etc.) (FAO/ WHO 2009).

Ces substances sont classées selon divers critères, tels que le type d'organisme nuisible ciblé (fongicide, herbicide, insecticide, etc.), la composition chimique (par exemple, insecticides organiques synthétiques : organochlorés, organophosphorés, carbamates et pyrèthroïdes) et le mode d'entrée dans l'organisme (**Fig. 12**) (Akashe et al. 2018).

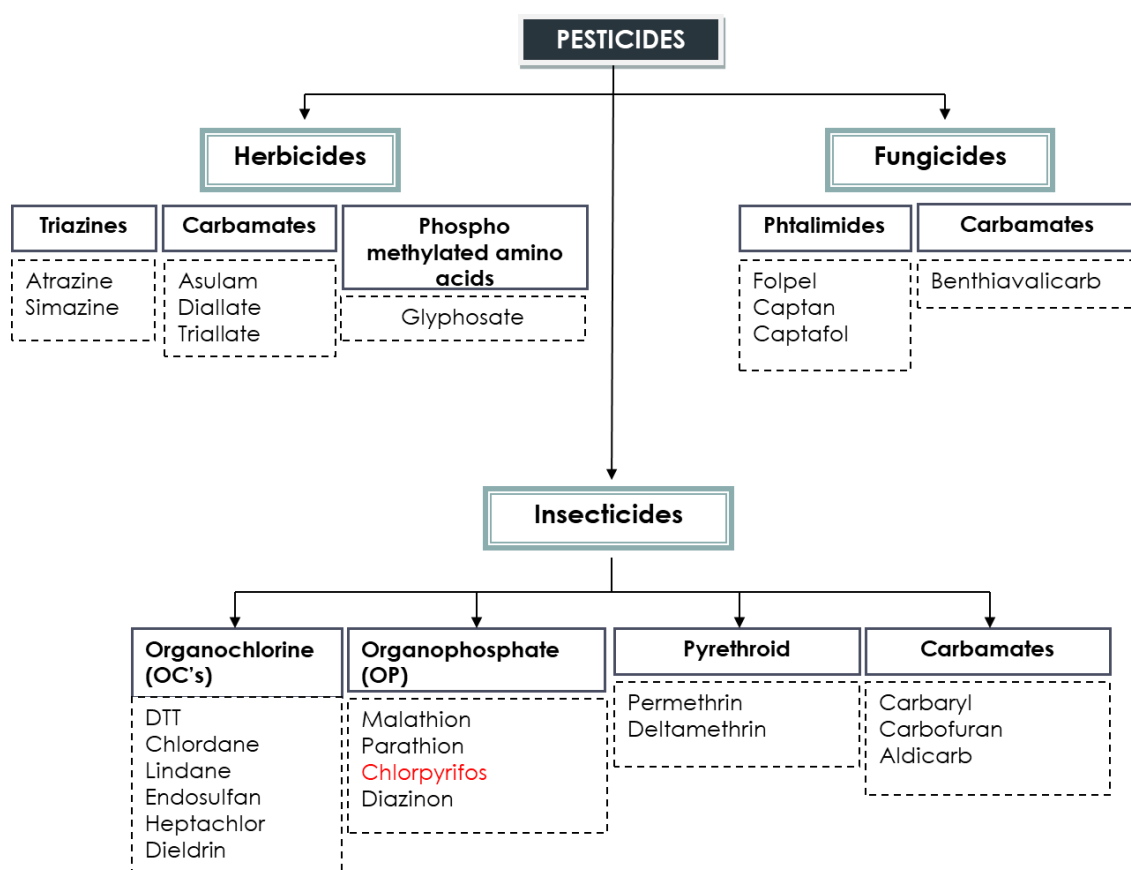


Figure 12: Classification des pesticides, adapté de (Thany et al. 2013).

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme humain par plusieurs voies : cutanée, respiratoire et digestive (Akashe et al. 2018). L'exposition cutanée se produit principalement chez les travailleurs agricoles et les applicateurs de pesticides, qui manipulent directement ces substances. Les pesticides peuvent être absorbés à travers la peau, surtout en cas de contact prolongé ou de mauvaise utilisation

des équipements de protection individuelle. L'inhalation de pesticides peut se produire quand l'application de ces produits est sous forme de pulvérisation. Les particules et les vapeurs de pesticides peuvent être inhalées, pénétrant ainsi dans les voies respiratoires et les poumons (Akashe et al. 2018; El Khayat El Sabbouri et al. 2020). La voie alimentaire est la principale source d'exposition pour la population générale (Nougadère et al. 2014; Baudry et al. 2021). Les résidus de pesticides présents sur les fruits, légumes, céréales et autres produits alimentaires peuvent être ingérés. Une fois dans le système digestif, ces résidus entrent en contact avec le MI, peuvent être absorbés par la muqueuse intestinale et entrer dans la circulation sanguine, atteignant ainsi divers organes et tissus (Chedik et al. 2018; Guibourdenche et al. 2021a).

Leur utilisation a considérablement augmenté depuis le début du XXe siècle, contribuant à la sécurité alimentaire mondiale et l'augmentation des rendements agricoles pour s'adapter à la croissance démographique (Fig. 13).

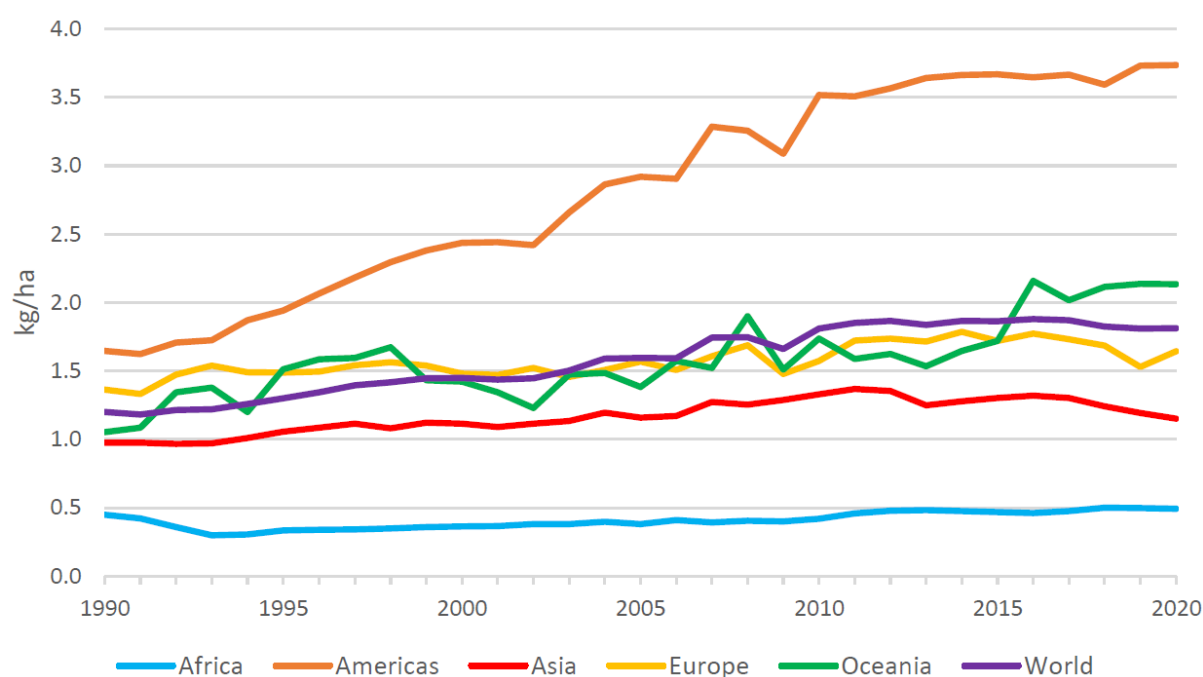


Figure 13: Evolution de l'utilisation des pesticides en kg/ hectare des continents, de 1990 à 2020 (FAOSTAT 2022).

Cependant, l'utilisation intensive des pesticides a soulevé des préoccupations concernant leurs effets sur la santé humaine et l'environnement. Les résidus de pesticides peuvent persister dans les sols, l'eau, l'air et surtout dans les produits alimentaires, la voie alimentaire devenant ainsi une voie d'exposition majeure pour l'Homme (Carrasco Cabrera and Medina Pastor 2021). Ils sont omniprésents dans l'environnement, et cette persistance entraînant une exposition chronique de la population représente un enjeu de santé publique majeur (Carvalho 2017; Supreeth and Raju 2017). Cela suscite des inquiétudes croissantes quant à leurs effets sur la santé des populations les plus vulnérables, comme la femme enceinte et le nouveau-né, surtout que les organophosphorés franchissent la barrière placentaire

et sont détectés dans le méconium (Tourneux et al. 2014; Wright 2017; Onchoi et al. 2020; Fuhler 2020; Djekkoun et al. 2022a).

Bien que conçus pour éliminer les nuisibles, des études ont montré que les pesticides ont des effets néfastes sur la santé humaine, contribuant ainsi à un problème de santé publique mondial (Yadav and Devi 2017; Lopes-Ferreira et al. 2022). Leur mode d'action cible les systèmes physiologiques des organismes nuisibles qu'ils éliminent, mais cela peut également entraîner des effets néfastes chez les espèces non ciblées, notamment chez l'Homme, en raison des similitudes phylogénétiques dans les systèmes : digestif, respiratoire et nerveux (Akashe et al. 2018). Ces résultats ont conduit à des restrictions sur l'utilisation et la production des pesticides, ainsi qu'à l'interdiction de certaines substances. Après l'interdiction du dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) dans plusieurs pays, l'utilisation de pesticides ayant moins de risque que les organochlorés sur la santé, tels que les organophosphorés et les carbamates, s'est développée (Abubakar et al. 2019). Depuis, les insecticides organophosphorés et en particulier le Chlorpyrifos (CPF), ciblant le système nerveux des insectes en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), ont été utilisés en grandes quantités pendant de nombreuses années (Van Melis et al. 2023).

Le CPF a été largement employé à l'échelle mondiale pour la gestion des nuisibles en agriculture. En particulier, cet insecticide a été largement utilisé en France qui fait partie des premiers utilisateurs de pesticides en Europe, surtout dans la région agricole des Hauts-de-France où plus de 8 tonnes de pesticides sont déversés par an (Djekkoun et al. 2021) (Fig. 14).

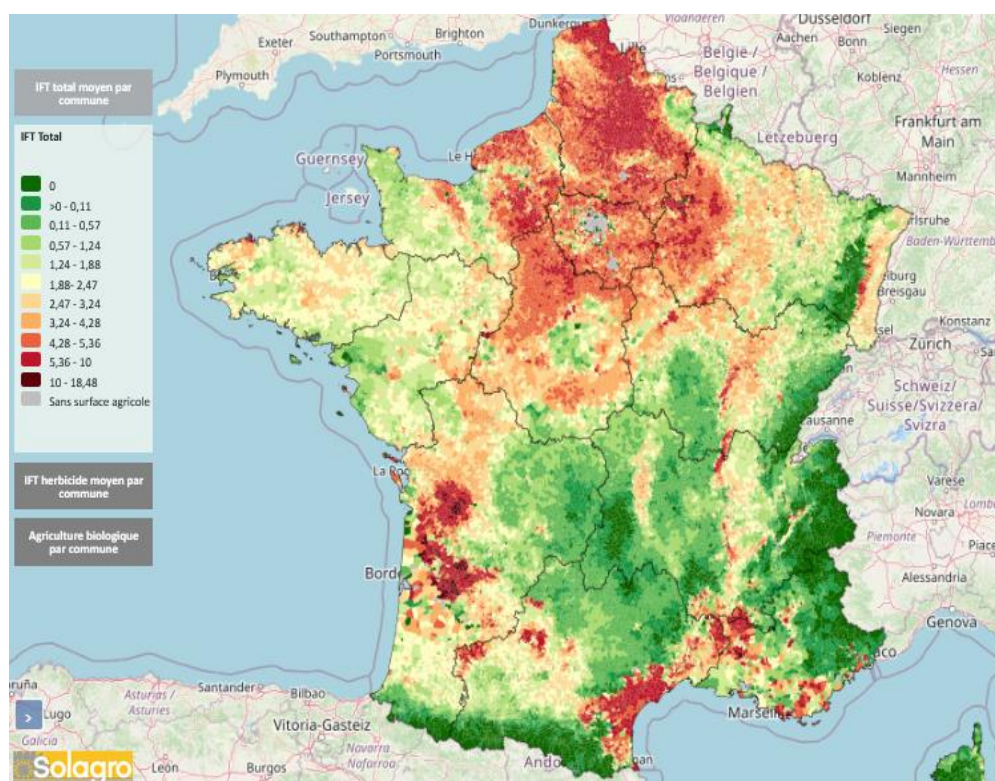


Figure 14: Représentation de l'intensité d'utilisation géographique de pesticides en France (Solagro).

Les résidus du CPF peuvent donc être encore retrouvés dans les sols (Supreeth and Raju 2017; Sabzevari and Hofman 2022). En effet, la quantité de ces résidus varie en fonction de plusieurs facteurs, tels que les pratiques agricoles antérieures, conditions environnementales, et les processus naturels de décomposition (Supreeth and Raju 2017). Cela va dépendre aussi de la quantité initiale utilisée dans les champs et la fréquence d'application de cette molécule. Le CPF, appliqué pendant plusieurs décennies et en grande quantité, se lie aux plantes, aux particules de sol ou aux sédiments. Après une certaine durée, la molécule mère est soit volatilisée, hydrolysée, ou biodégradée en fonction des propriétés physico-chimiques du pesticide. La volatilisation dépend de la concentration, la température et les propriétés du sol. Quant à sa biodégradation, elle dépend du type et du mélange de microorganismes habitant le sol, cette molécule pouvant être métabolisés par les bactéries du sol (Gilani et al. 2016; Liu et al. 2016). Tous ces facteurs font que la demi-vie de ce pesticide n'est pas constante : elle peut être d'une centaine de jours comme persister jusqu'à 17 ans (Supreeth and Raju 2017). Le CPF est absorbé par toutes les voies d'exposition. Des analyses urinaires réalisées sur des volontaires humains exposés indiquent qu'environ 70 % de la substance est absorbée par voie orale (Nolan et al. 1984; Rathod and Garg 2017). Une fois dans l'organisme, le CPF est distribué dans tout le corps, puis métabolisé dans le foie par le CYP. Ce processus remplace le groupe soufre du CPF par un groupe oxygène, créant ainsi le CPF-oxon, un métabolite encore plus toxique que le CPF lui-même. La détoxification du CPF-oxon implique des enzymes oxydases qui l'hydrolysent en diéthylphosphate (DEP), diéthylthiophosphate (DETP) et 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) (Rathod and Garg 2017). Le TCP est un métabolite spécifique du CPF, tandis que le DEP et le DETP peuvent être détectés après exposition à d'autres organophosphorés (Fig. 15) (Sancho and Pozo 2000; Yang et al. 2019).

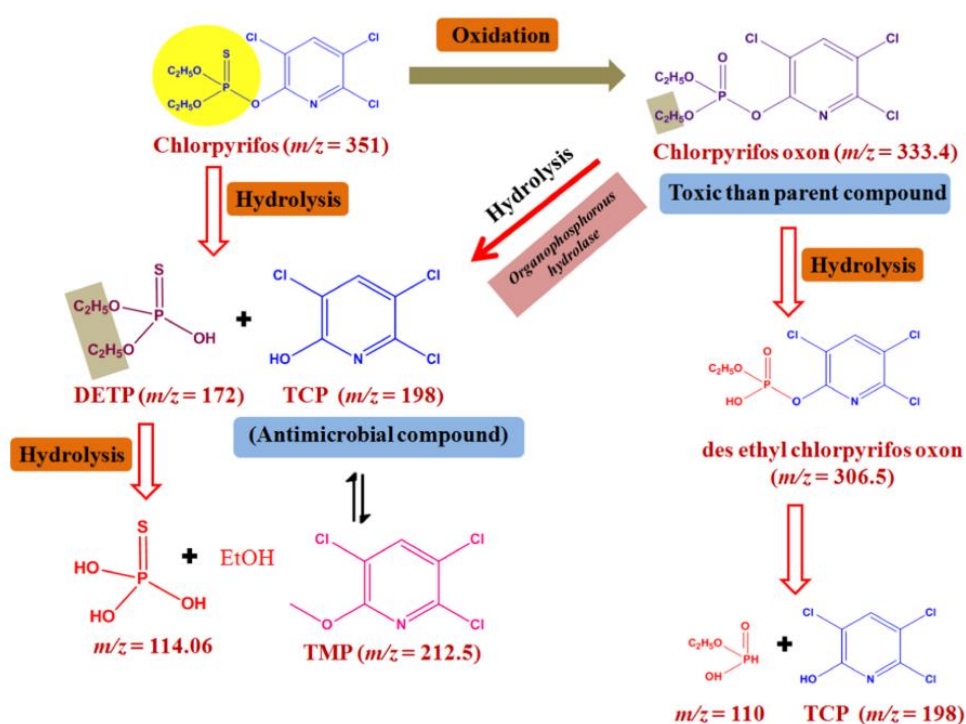


Figure 15: Biotransformation du Chlorpyrifos (Supreeth and Raju 2017).

C'est la bioactivation métabolique du CPF en CPF-oxon qui provoque une inhibition irréversible de l'AChE, empêchant ainsi la dégradation de l'acétylcholine (ACh), qui est un neurotransmetteur essentiel à la communication entre les cellules nerveuses. L'accumulation d'ACh dans la fente synaptique entraîne une surexcitation des cellules neuronales, provoquant un effondrement du système nerveux chez les insectes (National Pesticide Information Center) (NPIC). De la même manière, chez les vertébrés supérieurs, en particulier chez les humains, le CPF exerce un effet cholinergique et a également démontré une large gamme d'effets non cholinergiques.

B. Règlementations et limites d'utilisation des pesticides

En raison des études montrant ses effets néfastes sur la santé (neurotoxique, métabolique et reprotoxique) (Li et al. 2019; Djekkoun et al. 2022a; Van Melis et al. 2023; Lahimer et al. 2023), le CPF a été récemment interdit d'usage aux États-Unis et en Europe mais pas de production (EFSA 2019; EPA 2021), et il continue d'être utilisé dans de nombreux pays, notamment en Chine et en Inde (Ubaid ur Rahman et al. 2021; Abou Diwan et al. 2023). Cependant, l'utilisation du CPF reste autorisée pour la lutte contre les moustiques, dans la culture du tabac, sur les plantations non destinées à l'alimentation, ainsi que sur les denrées alimentaires destinées à l'exportation selon les spécifications des acheteurs étrangers (EPA 2021; IOWA 2022). Ces restrictions n'empêchent pas donc l'accumulation du CPF et du reste des organophosphorés dans les sols et la contamination de l'eau.

Les effets qu'entraînent ces substances toxiques sur la santé amènent les organisations sanitaires comme l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), et l'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), à préconiser la mise en place de nombreuses mesures visant à réduire et contrôler l'exposition de la population aux produits phytosanitaires présents dans les denrées alimentaires.

Les organismes de santé publique définissent des valeurs limites toxicologiques (VTR) qui sont des seuils pour évaluer les risques liés à l'exposition aux substances chimiques (Kuchheuser and Birringer 2022). Ces valeurs jouent un rôle essentiel dans la protection de la santé humaine en permettant de fixer des niveaux acceptables d'exposition aux produits chimiques présents dans l'environnement et les produits alimentaires ou dans les milieux professionnels. Elles sont établies à partir d'études toxicologiques et épidémiologiques, et intègrent souvent des marges de sécurité pour prendre en compte les variabilités interindividuelles et les incertitudes scientifiques. Lors de la détermination des VTR, on prend en compte l'effet indésirable le plus sensible observé à la plus faible dose dans les groupes les plus vulnérables, ce qui permet d'identifier l'effet critique.

Une limite maximale de résidus (LMR) a été instaurée pour minimiser les risques associés à l'ingestion de résidus de pesticides dans les aliments (Nougadère et al. 2014; Kuchheuser and Birringer 2022). Ces seuils réglementaires visent à garantir que la quantité de résidus de pesticides dans les aliments ne

dépasse pas un niveau jugé sans danger pour la consommation humaine. Les produits dépassant ces seuils sont signalés par le RASFF (European Rapid Alert System for Food and Feed).

De plus, une dose journalière admissible (DJA) est calculée, qui est l'une des valeurs les plus couramment utilisées, représentant la quantité de la substance chimique à laquelle une personne peut être exposée quotidiennement sans risque notable pour la santé. Cette valeur est calculée à partir du No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), qui est la dose maximale sans effet indésirable observé chez l'animal, avec l'application d'un facteur de sécurité ou d'incertitude pour protéger l'Homme (EFSA 2019). La DJA du CPF est de 0,01 mg/kg de poids corporel/jour, obtenue en appliquant un facteur de sécurité de 100 à la NOAEL établie dans des études de toxicité de la dose inhibant l'AChE, par voie orale chez le rat (ANSES 2011; Guibourdenche et al. 2021a; Djekkoun et al. 2022a).

Cependant, la DJA ne couvre pas toujours l'ensemble de la population (nouveau-nés, fœtus, adultes), surtout si elle n'est pas basée sur des études de toxicité développementale (fœto/embryotoxicité).

C. Exposition de la population sensible aux contaminants alimentaires : qui est concerné ?

Malgré la mise en place de réglementations et limites d'utilisation des pesticides comme le plan Ecophyto (réduction de l'utilisation de 50 % d'ici 2025), l'exposition de la population reste importante dans le monde (Guichard et al. 2017; Djekkoun et al. 2021). La première population directement concernée est celle des agriculteurs ainsi que leurs familles, il s'agit ici de l'exposition professionnelle. De nombreux cas d'empoisonnement ont été documentés, ainsi que l'émergence de cancers et de maladies neurodégénératives liés à l'utilisation professionnelle de ces substances (Mostafalou and Abdollahi 2016; Rathod and Garg 2017; Doroszkiewicz et al. 2021; Di Vincenzo et al. 2023). Ces produits chimiques atteignent la population générale via l'air, les sols et l'eau (exposition environnementale). Ensuite, dans les pays où l'utilisation domestique des pesticides est autorisée (exposition domestique), leurs métabolites ont été retrouvés dans le sang et le lait maternel (Brahmand et al. 2019). De plus, des études ont montré la présence de métabolites de pesticides dans le méconium (premières selles du nouveau-né), soulignant ainsi leur passage à travers la barrière placentaire (Berton et al. 2014; Onchoi et al. 2020). Cela suscite des préoccupations concernant les femmes enceintes et les enfants, qui sont particulièrement vulnérables à ces produits toxiques. La période de vulnérabilité est étroitement liée au concept du Developmental Origins of Health and Disease (DoHAD), qui postule que les expositions environnementales au cours des périodes critiques de développement, telles que la période prénatale et la petite enfance (les 1000 premiers jours de vie), ont des répercussions durables sur la santé à long terme (Wright 2017; Balaguer-Trias et al. 2022). Alors que les études toxicologiques sur l'effet des expositions se concentrent sur la relation dose-effet, le concept de la DoHAD relève la question de la période de l'exposition.

Les femmes enceintes, les fœtus, les nourrissons et les jeunes enfants sont particulièrement sensibles aux effets des pesticides en raison de leur développement rapide et de leur capacité limitée à métaboliser

et à éliminer ces substances. La vulnérabilité au CPF est plus prononcée pendant le développement in utero et chez les nouveau-nés, comparée aux adultes (Bruckner 2000; Wright 2017). Leurs systèmes de détoxification, comme les enzymes du foie, encore immatures, les rendent moins capables d'éliminer efficacement les substances toxiques. En particulier, cette susceptibilité accrue est attribuée à des niveaux inférieurs de l'enzyme paraoxonase 1 (PON1) chez les enfants par rapport aux adultes, enzyme responsable de la détoxification du CPF (Rathod and Garg 2017). De ce fait, le CPF peut provoquer des effets chez les nouveau-nés même à des doses inférieures à celles qui induisent une inhibition de l'AChE.

La durée de l'exposition est également un paramètre dont va dépendre les effets de ces substances toxiques sur la santé. L'exposition aiguë correspondant à une dose très importante ponctuelle dans le milieu professionnelle ou bien dans un contexte suicidaire (Rathod and Garg 2017). Ce type d'exposition peut être mortel, d'où l'élaboration des doses létales (DL50 : dose ponctuelle induisant la mort de 50 % d'un groupe animal d'essai).

En revanche, quand il s'agit d'une exposition répétée à de faibles doses, on parle de l'exposition chronique à court terme ou à long terme.

L'exposition chronique aux pesticides pendant ces périodes critiques crée un environnement à risque entraînant des altérations du développement neurologique, immunitaire et endocrinien, augmentant le risque de maladies chroniques à l'âge adulte (Balaguer-Trias et al. 2022; Matsuzaki et al. 2023).

Afin de comprendre comment ces expositions chroniques à faible dose peuvent entraîner une maladie intestinale ou neurodégénérative à long terme, la dysrégulation du microbiote (dysbiose) par ces contaminants alimentaires doit être étudiée en premier. En effet, comme détaillé précédemment, une connexion importante entre l'intestin et le cerveau est le microbiote. Ainsi, tout déséquilibre au niveau de la population bactérienne peut affecter les deux parties de cet axe. Les substances ingérées qui peuvent perturber le microbiote se trouvent dans l'alimentation, les médicaments, les antibiotiques et, plus particulièrement dans notre étude, les résidus de pesticides. Les résidus de pesticides sont des contaminants présents dans les aliments et l'eau. Certains d'entre eux modifient la composition du MI et perturbent, voire traversent, la BI. Une translocation bactérienne prolongée à travers cette barrière dont la perméabilité augmente peut induire une inflammation systémique, susceptible de perturber la communication entre l'intestin et le cerveau avec des conséquences sur la BHE, et d'aggraver des troubles neuropsychiatriques tels que l'anxiété et la dépression.

Chapitre VI : Conséquences de l'exposition du microbiote aux contaminants alimentaires

A. Impact des pesticides sur le microbiote intestinal et les barrières : Dysbiose et translocation bactérienne

Bien que le système nerveux est la cible principale des organophosphorés, le microbiote intestinal est une cible collatérale de leur toxicité (Sharma et al. 2023).

En tenant compte de l'absorption par voie orale, avant que le CPF n'atteigne le cerveau pour inhiber l'acétylcholinestérase, le premier organe en contact avec le CPF ou tout autre contaminant alimentaire est le tractus digestif. Il est donc crucial d'étudier les effets des organophosphorés sur l'intestin. En se basant sur la NOAEL de 1 mg/kg/jour pour la progéniture des rats, Joly Condette et al. ont examiné les effets d'une exposition périnatale au CPF à des doses de 1 mg/kg/jour et 5 mg/kg/jour sur le microbiote intestinal de la descendance des rats à deux stades de développement : le sevrage (jour 21, D21) et l'âge adulte (jour 60, D60) (Joly Condette et al. 2015; Reygner et al. 2016b). Leurs résultats montrent que l'exposition au CPF induit une dysbiose intestinale, caractérisée par une diminution des *Lactobacillus spp.* dans l'iléon, le cæcum et le côlon, ainsi qu'une réduction des *Bifidobacterium spp.* dans l'iléon à D21 et dans le côlon à D60. De plus, ils ont observé une augmentation des *Clostridium spp.* et *Staphylococcus spp.* dans le cæcum et le côlon à D21. Ces résultats indiquent que l'exposition au CPF réduit les bactéries potentiellement bénéfiques tout en augmentant celles potentiellement pathogènes. Le traitement au CPF a également entraîné une diminution de l'épaisseur épithéliale de l'iléon et du côlon.

Étant donné que cette première étude s'appuyait sur des tests microbiologiques classiques, les chercheurs ont approfondi leur investigation en identifiant plus précisément les bactéries intestinales par la technique MALDI-TOF-MS et en explorant la translocation bactérienne des segments intestinaux vers des organes stériles (Joly Condette et al. 2016). Grâce au typage moléculaire, ils ont confirmé la translocation de *Staphylococcus aureus* vers les tissus adipeux, les reins et les plaques de Peyer chez 12,5 % des segments intestinaux des rats exposés au CPF, ainsi qu'une translocation de *Enterococcus faecalis* à hauteur de 5 % vers le foie. Cette translocation s'explique logiquement par l'augmentation de la perméabilité intestinale, elle-même induite par une diminution de l'expression transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines de jonction serrée, ZO-1 et claudine 4, dans l'iléon et le côlon, notamment au jour 21 (D21) (Condette et al. 2014).

L'exposition au CPF dans le modèle intestinal humain artificiel in vitro (SHIME® - Simulateur de l'écosystème microbien intestinal), combiné avec des cellules Caco-2/TC-7, a également montré une diminution de l'expression des gènes des JS, occludine et ZO-1, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de la chimiokine pro-inflammatoire interleukine-8 (IL-8) (Réquillé et al. 2018). Zhao et al. ont aussi confirmé une perméabilité intestinale anormale chez les souris exposées au CPF, accompagnée d'une dysbiose du microbiote (baisse des *Lactobacillaceae* et *Firmicutes*, et augmentation des *Bacteroidaceae* et *Bacteroides*), ainsi que des altérations dans le métabolisme des

AGCC qui ont conduit à une inflammation intestinale (Zhao et al. 2016). Ces résultats sont attendus, car le traitement au CPF modifie la composition de la communauté microbienne qui produit ces métabolites. De plus, une analyse sérique a révélé une augmentation du LPS à la suite de l'exposition au CPF. Une étude *in vivo* a démontré qu'une exposition chronique à 0,3 mg/kg/jour de CPF entraîne une augmentation significative du TNF- α et de l'IL-6 dans le sérum des rats exposés (Li et al. 2019).

Ces observations pourraient expliquer les altérations de l'intégrité fonctionnelle et de la structure de la BHE causées par le CPF, comme l'ont mis en évidence Parran et al. en travaillant sur un modèle *in vitro* de BHE (CEC bovines et astrocytes de rats nouveau-nés) (Parran et al. 2005). Une autre étude utilisant un modèle *in vitro* de BHE (CEC de rats et astrocytes de rats nouveau-nés) a montré qu'une exposition à court terme au CPF, même à faibles concentrations, modifie les niveaux d'expression des gènes de la claudine 5, de ZO-1 et de TRPC4 (canaux ioniques transitoires potentiels canoniques), compromettant ainsi l'intégrité de la BHE. Le TRPC régule l'entrée du calcium, qui module la perméabilité paracellulaire des CEC de la BHE (Li and Ehrich 2013). La claudine 5 est un acteur clé dans le maintien de l'étanchéité de la BHE, tandis que ZO-1 soutient l'architecture des JS (Abbott et al. 2010; Profaci et al. 2020). Ainsi, le CPF cible les principaux acteurs de l'intégrité de la BHE.

B. Conséquences de l'exposition aux pesticides sur l'axe microbiote-intestin-cerveau : apparition de maladies à long terme

L'exposition aux pesticides organophosphorés comme le CPF, a des effets délétères sur l'axe microbiote-intestin-cerveau, perturbant ainsi des processus physiologiques clés. En perturbant la composition du MI, ces substances induisent une augmentation de la perméabilité intestinale, aussi appelée "leaky gut", qui permet la translocation de bactéries pathogènes et de toxines dans la circulation systémique, favorisant ainsi une inflammation chronique de bas grade. Cette inflammation systémique, conjuguée à une dysbiose persistante, affecte l'axe microbiote-intestin-cerveau. Des études ont montré que les perturbations de cet axe peuvent contribuer à l'apparition de troubles neurodégénératifs et psychiatriques à long terme, tels que la maladie de Parkinson, la dépression ou l'anxiété (Rutsch et al. 2020; Brittany D. Needham et al. 2022). L'exposition chronique aux pesticides, en modifiant les mécanismes de régulation des neurotransmetteurs et en altérant la fonction de la BHE, augmente également le risque de développement de ces pathologies. Rutsch et al. ont expliqué comment l'inflammation contrôlée par l'inflammasome NLRP3 perturbe les 3 composants de l'axe (le MI, la BI et la BHE) à la suite d'une augmentation du LPS et de l'IL-1 β (**Fig. 16**) (Rutsch et al. 2020). Comme le phénomène observé au niveau de la BI, l'expression des JS est dérégulée. Cela est de même accompagné de l'altération des taux des molécules neuroactives comme le GABA, la dopamine et la glutamine modulant ainsi le SNC. En effet, l'atteinte de la BHE facilite la diffusion des toxines et des médiateurs inflammatoires dans le

cerveau, exacerbant ainsi les réponses neuroinflammatoires et augmentant les risques de troubles cognitifs et psychiatriques à long terme.

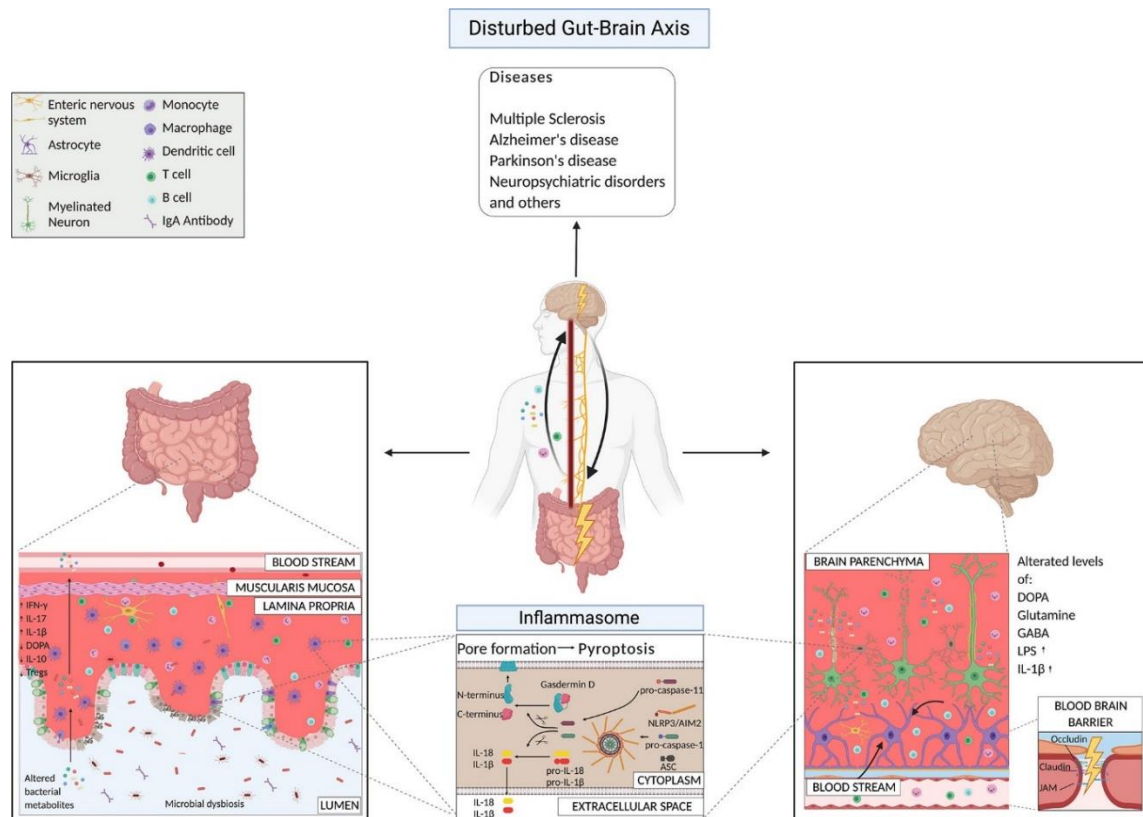


Figure 16: La perturbation de la voie de communication des métabolites bactériens et la voie de l'inflammasome au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau dans des conditions physiopathologiques (Rutsch et al. 2020)

C. Exposition cocktail (combinaison de plusieurs pesticides ou avec des lipides saturés : régime High Fat Diet)

Des études portant sur l'exposition de la population montrent que nous sommes quotidiennement exposés à un mélange de pesticides persistants dans l'environnement et non seulement un seul (Baudry et al. 2021). Ces études montrent que l'exposition aux résidus de pesticides dépend du régime alimentaire adopté (végétarien, omnivore, etc...) (Fig. 17).



Figure 17: Contribution des aliments végétaux à l'exposition aux résidus de pesticides($\mu\text{g/kg p.c./jour}$), 1 : omnivores, 2 : pesco-végétariens, 3 : végétariens, 4 : Vegan (Baudry et al. 2021)

L'un des aspects les plus complexes de l'exposition aux pesticides réside dans la notion d'exposition cocktail, c'est-à-dire l'exposition simultanée à plusieurs substances chimiques ayant des mécanismes d'action variés et des effets synergiques ou additifs (Smith et al. 2020; Martins-gomes et al. 2022). Cette problématique est encore mal comprise car la majorité des études toxicologiques se concentrent sur les effets d'un seul pesticide, sans tenir compte des mélanges complexes auxquels les humains sont régulièrement exposés.

Selon le rapport de 2019 de l'Union Européenne, plusieurs résidus de pesticides sont présents dans les produits alimentaires de notre quotidien (Nougadère et al. 2014; Carrasco Cabrera and Medina Pastor 2021). Parmi les pesticides les plus détectés dans l'alimentation, nous retrouvons le CPF, le glyphosate (herbicide) et l'imazalil (fongicide) (Carrasco Cabrera and Medina Pastor 2021; Baudry et al. 2021).

Par conséquent, les recherches commencent à se concentrer sur l'évaluation de l'impact de ces substances qui doit désormais prendre en compte l'effet cumulatif chronique ainsi que l'effet cocktail.

Comme le CPF, il a été démontré que l'imazalil provoque une dysbiose intestinale et une inflammation du colon (Jin et al., 2016). Le glyphosate modifie également la composition microbienne intestinale chez les rats et induit des réponses inflammatoires au niveau de l'intestin (Tang et al., 2020). De plus, une étude en 2018, montre que le glyphosate a un impact sur l'axe intestin-cerveau en favorisant la prolifération des bactéries *Clostridium* chez des sujets autistes (Argou-Cardozo & Zeidán-Chuliá, 2018).

Étant donné que l'exposition aux pesticides est souvent accompagnée d'une consommation excessive de graisses saturées et de sucres raffinés (régimes déséquilibrés riches en aliments transformés), d'autres études ont évalué l'impact de l'association entre le CPF et un régime riche en graisses (HFD) sur le MI (Djekkoun et al. 2022b) et la BI (Guibourdenche et al. 2021a, b). Guibourdenche et ses collègues ont confirmé que l'exposition chronique périnatale à la dose de NOAEL de CPF seule provoque une diminution de l'expression des gènes des JS, tout en démontrant une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, un effet exacerbé par l'association avec un régime HFD. L'addition des effets de ces facteurs environnementaux créant un environnement à risque est à l'origine de l'émergence des maladies métaboliques (diabète et obésité), intestinales et neurodégénératives (Di Vincenzo et al. 2023).

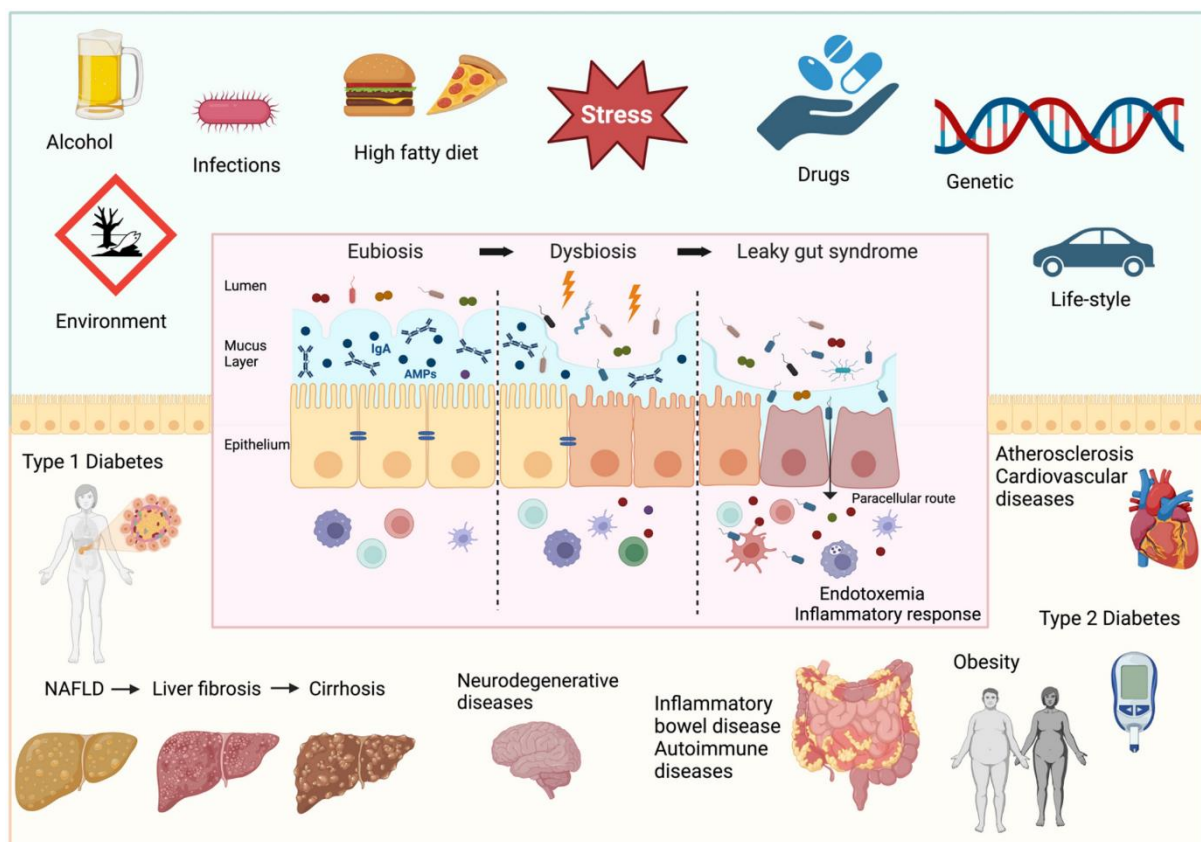


Figure 18: Emergence des maladies liées aux expositions cocktails aux facteurs environnementaux (Di Vincenzo et al. 2023).

En résumé, l'exposition aux pesticides et aux contaminants alimentaires est une préoccupation majeure pour la santé publique, en particulier pour les populations vulnérables. Comprendre les voies d'entrée, les effets de l'exposition cocktail et les mécanismes sous-jacents est essentiel pour développer des stratégies de prévention et de réduction des risques. D'une part, l'exposition cocktail nécessite une attention particulière dans la recherche toxicologique et épidémiologique, car elle reflète plus fidèlement les conditions réelles d'exposition humaine et met en lumière les défis liés à l'évaluation des risques et à la réglementation des substances chimiques dans l'alimentation.

D'autre part, des études récentes sur les effets des pesticides mettent en lumière un nouveau concept : celui de la récupération. En effet, une étude portant sur les effets de différentes doses d'imazalil sur le MI de souris a évalué le temps de récupération après 2 et 15 semaines d'exposition. Les chercheurs ont constaté qu'après 30 ou 45 jours d'imprégnation avec ce fongicide, la composition bactérienne au niveau des phylums revenait à des niveaux comparables à ceux des groupes témoins (Jin et al. 2018). Cela montre que la modification de la composition du microbiote est dynamique et tend à retrouver un équilibre (phénomène de résilience) (Lozupone et al. 2012; Ribeiro et al. 2022). De plus, de nouveaux essais cliniques ont révélé que les voies de communication de l'axe intestin-microbiote-cerveau sont sensibles à la modulation nutritionnelle, ce qui représente un intérêt crucial en nutrition clinique. En effet, les interventions diététiques, ainsi que la supplémentation en probiotiques et prébiotiques, permettent de remodeler la composition bactérienne et sont désormais administrées sous forme de « psychobiotiques » pour traiter des troubles neurologiques en raison de leurs effets bénéfiques sur le cerveau (Ribeiro et al. 2022). Cela signifie que la modulation du MI influence positivement l'ensemble de l'axe microbiote-intestin-BHE.

Chapitre VII : Stratégie nutritionnelle préventive cible du microbiote intestinal et conséquences bénéfiques sur l'axe microbiote-intestin-cerveau : utilisation de prébiotique

A. Introduction aux prébiotiques et à leurs bienfaits

Le concept de l'utilisation des probiotiques pour moduler la microflore intestinale a été initié au XIX^e siècle par Élie Metchnikoff, qui a théorisé que « la santé et la longévité pourraient être atteintes en manipulant la flore intestinale, c'est-à-dire en remplaçant les microbes nuisibles par des microbes bénéfiques ». Quant aux prébiotiques, ils ont été introduits par Gibson et Roberfroid en 1995 (Idrees et al. 2022). Parmi les espèces bénéfiques pouvant avoir un effet probiotique, nous retrouvons des bactéries des genres *Bifidobactéries* (*B. longum*, *B. breve*), *Lactobacilles* (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*) (Maes et al. 2019; Morais et al. 2021; Buffet-Bataillon et al. 2021; Anderson et al. 2023) et *Clostridium* de cluster IV et XIV (comme les *Clostridium* qui produisent le butyrate : *C. butyricum* et *Faecalibacterium prausnitzii*) (Sun et al. 2018; Guo et al. 2020; Cuffaro et al. 2021; Torres-Maravilla et al. 2022; Martín et al. 2023).

Les prébiotiques sont des composés non digestibles d'origine alimentaire qui jouent un rôle essentiel dans la santé intestinale en stimulant la croissance et l'activité des bactéries bénéfiques déjà présentes dans le microbiote intestinal (Rose et al. 2021). Contrairement aux probiotiques, qui sont des micro-organismes vivants, les prébiotiques servent de "nourriture" à ces microbes bénéfiques, tels que les *Bifidobactéries* et les *Lactobacilles*. Les principaux prébiotiques incluent les fructo-oligosaccharides (FOS), l'inuline, les galacto-oligosaccharides (GOS), et certains types de fibres résistantes (Waligora-Dupriet et al. 2007; Uerlings et al. 2020). On les retrouve naturellement dans divers aliments comme les légumes, les fruits, les céréales, et les produits laitiers.

Leur consommation régulière présente de nombreux avantages pour la santé. En favorisant une composition microbienne bénéfique, les prébiotiques contribuent à renforcer la BI, réduisant ainsi la perméabilité intestinale et le risque de translocation de pathogènes. La fermentation des prébiotiques par les bactéries intestinales produit des AGCC qui possèdent des effets anti-inflammatoires et renforcent l'intégrité de la muqueuse intestinale (Dalile et al. 2019).

B. Rôle de l'inuline au sein du microbiote intestinal et conséquences sur les barrières et prévention de l'effet des pesticides

La supplémentation en prébiotiques et probiotiques est désormais perçue comme une approche prometteuse pour atténuer les effets néfastes des contaminants alimentaires (Akimowicz et al. 2021). En effet, certaines souches bactériennes probiotiques, principalement des souches de *Lactobacillus*, peuvent se lier aux xénobiotiques, réduisant ainsi leur toxicité (par biotransformation) et la quantité absorbée par l'hôte (Daisley et al. 2019). Les *Lactobacillus spp.* sont particulièrement reconnus pour leurs effets anti-inflammatoires (D'Amelio 2017). Afin d'exercer leurs effets bénéfiques, ces souches probiotiques nécessitent des substrats pour leur croissance. Les prébiotiques jouent en partie ce rôle, en étant ces substrats « ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent sélectivement la croissance

et l'activité de certaines espèces bactériennes bénéfiques déjà présentes dans le côlon, améliorant ainsi la santé de l'hôte » (Gibson and Roberfroid 1995; Djekkoun et al. 2021). Parmi les prébiotiques, on trouve des FOS tels que l'inuline (retrouvée principalement dans les artichauts et la racine de chicorée), des GOS, des trans-galacto-oligosaccharides (TOS) et des amidons résistants, présents dans divers fruits, légumes, céréales et le lait (Davani-Davari et al. 2019; Long-Smith et al. 2020).

L'inuline et les arabinoxylo-oligosaccharides ont été montrés pour augmenter la production de certains AGCC, comme l'acétate, le propionate et le butyrate, et modifier la composition microbienne en favorisant les *Bacteroidetes* par rapport aux *Firmicutes* (Reygner et al. 2016b; Van Den Abbeele et al. 2018). De manière similaire, la sialyllactose (extraite du lait) et les GOS ont induit la différenciation des cellules épithéliales dans un modèle Caco-2, modifiant la composition microbienne (augmentation des *Bacteroides* et *Bifidobacterium*) et augmentant ainsi la production d'AGCC (Perdijk et al. 2019). En effet, les AGCC produits par la fermentation des prébiotiques par les bactéries intestinales vont traverser les entérocytes et atteindre la circulation sanguine, apportant des effets bénéfiques à l'hôte (Davani-Davari et al. 2019). Une étude in vitro combinant un modèle Caco-2 et SHIME a démontré que l'arabinogalactane et les FOS réduisaient les cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8), augmentaient la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et amélioraient la perméabilité de la barrière intestinale (mesurée par la résistance électrique transépithéliale (TEER), dans le modèle Caco-2) (Daguet et al. 2016; Torres-Maravilla et al. 2022). Ces résultats soulignent l'effet direct des prébiotiques sur la fonction de la BI via la modulation de la composition microbienne et l'amélioration de la fonction de la BI en modifiant les JS (Rose et al. 2021).

Compte tenu de leurs effets bénéfiques sur la composition microbienne et l'intégrité de la BI, les chercheurs se sont intéressés à l'utilisation des prébiotiques en prévention ou en traitement pour atténuer les dommages dans des environnements inflammatoires ou des lésions causées par des contaminants alimentaires. Par exemple, le traitement préalable avec des GOS a permis de réduire les dommages de la barrière intestinale dans un contexte inflammatoire chez des souris exposées au LPS (Wang et al. 2021). De plus, la supplémentation en inuline chez des rats exposés au CPF, à un HFD, ou à une combinaison des deux, ainsi que dans des modèles in vitro (SHIME et Caco-2), a inversé les effets néfastes sur la composition microbienne, en augmentant la flore potentiellement bénéfique (*Lactobacillus* et *Bifidobacterium*), en diminuant les espèces potentiellement pathogènes (*Enterococcus* et *Enterobacteriaceae*), et en améliorant l'intégrité de la BI (Reygner et al. 2016b; Réquillé et al. 2018; Djekkoun et al. 2022a, b).

De nombreuses études ont donc montré le rôle de l'inuline (Uerlings et al. 2020) et des FOS (Wongkrasant et al. 2020) dans le renforcement de la BI grâce à l'assemblage des JS. Etant à l'interface de la voie médiée par le sang, et modulée par les AGCC, la question quant aux conséquences sur la BHE se pose (Fig. 15).

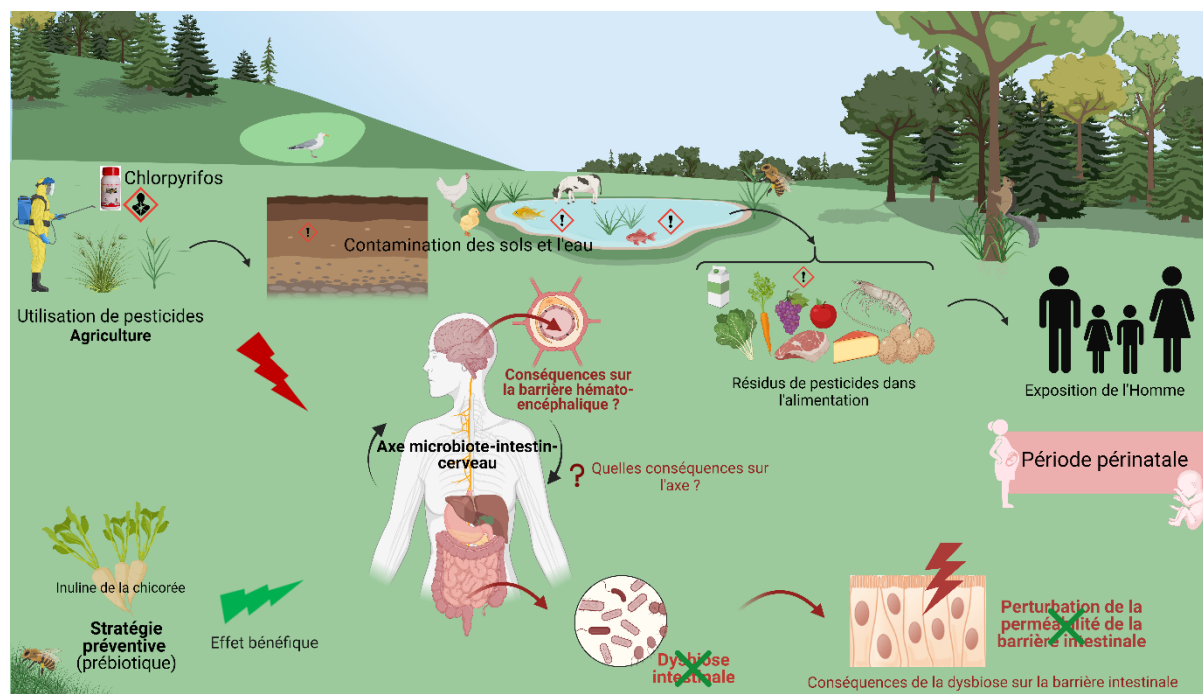


Figure 19: Effets des pesticides sur l'environnement et la santé de l'axe microbiote-intestin-cerveau pendant la période périnatale et la prévention par l'inuline. (Création personnelle sur BioRender; publiée dans The Conversation France)

Peu d'études se sont tournées vers les effets des prébiotiques sur la BHE. En effet, une étude sur des souris CUMS (Chronic Unpredictable mild stress), dont la perméabilité de la BHE est élevée, ont montré une restauration des niveaux de Claudine 5 (CLDN5) et de ZO-1 de la BHE après supplémentation en inuline (Wang et al. 2023). L'inuline a inversé la réponse inflammatoire cérébrale au CUMS par l'inhibition de la voie TLR4-MyD88-NF- κ B pour diminuer l'expression du TLR4 et LPS dans le cerveau. Une autre étude s'est intéressée sur l'effet bénéfique de l'inuline dans la réduction de la neuroinflammation en modulant le MI (Hoffman et al. 2019).

Toutefois, notre étude vise à étudier la prévention par les prébiotiques dans un contexte d'exposition aux pesticides (Djekkoun et al. 2022a; Abou Diwan et al. 2024).

Ainsi, l'utilisation des prébiotiques via la nutrition permet de moduler le MI avec des effets positifs sur les barrières. De nouvelles méthodes émergent, telles que les symbiotiques combinant à la fois les probiotiques et les prébiotiques mais aussi la transplantation fécale, une stratégie prometteuse contre la dysbiose, qui a montré des résultats encourageants dans le traitement de la maladie neurodégénérative (Smith and Parr-Brownlie 2019).

L'état de l'art a fait l'objet d'une revue de littérature.

Résumé

Des études expérimentales et épidémiologiques ont montré que l'exposition chronique à de faibles doses de résidus de pesticides présents dans l'alimentation affecte l'axe microbiote intestin-cerveau. Cet axe décrit la connexion physiologique et bidirectionnelle entre le microbiote intestinal (MI), la barrière intestinale (BI) et la barrière hémato-encéphalique (BHE).

L'axe microbiote intestin-cerveau est un domaine de recherche émergent qui met en lumière l'interaction complexe entre le système digestif et le système nerveux central. Le MI, composé de trillions de micro-organismes, joue un rôle crucial dans la digestion, la production de vitamines, et la modulation du système immunitaire. La BI, quant à elle, est une structure essentielle qui régule le passage des nutriments et empêche les agents pathogènes de pénétrer dans la circulation sanguine. La BHE protège le cerveau des substances potentiellement nocives présentes dans le sang.

L'axe microbiote intestin-cerveau est un axe clé dans la régulation des contaminants alimentaires, notamment les résidus de pesticides. Des observations précliniques ont rapporté une altération microbienne intestinale induite par l'exposition chronique aux résidus de pesticides, également connue sous le nom de dysbiose qui conduit à une translocation bactérienne une condition associée non seulement à des troubles gastro-intestinaux mais aussi à des maladies affectant d'autres organes distaux, tels que la BHE. Cependant, l'interaction entre les pesticides, le MI, la BI et la BHE n'est pas encore entièrement explorée.

Dans cette revue, nous considérons d'abord les similitudes et les différences entre ces deux barrières physiologiques et les différentes voies qui relient le MI et la BHE pour mieux comprendre le dialogue entre les bactéries et le cerveau. Nous discutons ensuite des effets de l'exposition chronique par voie digestive aux pesticides sur l'axe microbiote intestin-cerveau et sensibilisons au danger de l'exposition chronique, en particulier pendant la période périnatale (femmes enceintes et progéniture).

Nous détaillons enfin les stratégies de prévention pour atténuer les effets néfastes des pesticides, telles que les prébiotiques.

En conclusion, cette revue vise à fournir une compréhension approfondie des interactions complexes entre les pesticides, le MI, la BI et la BHE. Elle souligne l'importance de poursuivre les recherches dans ce domaine pour développer des stratégies de prévention et de traitement des maladies associées à la dysbiose induite par les pesticides.

Revue publiée dans International Journal of Molecular Sciences (IF : 4.9) en mars 2023.

**Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota–Blood–Brain Barrier Axis: A
Narrative Review**

Maria Abou Diwan ^{1,2}, Marwa Lahimer ¹, Véronique Bach ¹, Fabien Gosselet ², Hafida
Khorsi-Cauet ^{1,†} and Pietra Candela ^{2,*,†}

¹ PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01 UPJV/INERIS, Centre Universitaire de
Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens,
France

² Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300
Lens, France

[#] First co-authors contributed equally to this work.

[†] These authors contributed equally to this work.



Review

Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota–Blood–Brain Barrier Axis: A Narrative Review

Maria Abou Diwan ^{1,2}, Marwa Lahimer ¹, Véronique Bach ¹, Fabien Gosselet ² , Hafida Khorsi-Cauet ^{1,†} and Pietra Candela ^{2,*,†}

¹PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01, Centre Universitaire de Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardy Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens, France; maria.abou.diwan@u-picardie.fr (M.A.D.); marwa.lahimer@etud.u-picardie.fr (M.L.); veronique.bach@u-picardie.fr (V.B.); hafida.khorsi@u-picardie.fr (H.K.-C.)

²Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300 Lens, France; fabien.gosselet@univ-artois.fr

* Correspondence: pietra.candela@univ-artois.fr

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Abou Diwan, M.; Lahimer, M.; Bach, V.; Gosselet, F.; Khorsi-Cauet, H.; Candela, P. Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota–Blood–Brain Barrier Axis: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6147. <https://doi.org/10.3390/ijms24076147>

Academic Editors: Vasso Apostolopoulos, Majid Davidson and Tissa Wijeratne

Received: 6 March 2023

Revised: 17 March 2023

Accepted: 20 March 2023

Published: 24 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/>).

Abstract: Accumulating evidence indicates that chronic exposure to a low level of pesticides found in diet affects the human gut-microbiota–blood–brain barrier (BBB) axis. This axis describes the physiological and bidirectional connection between the microbiota, the intestinal barrier (IB), and the BBB. Preclinical observations reported a gut microbial alteration induced by pesticides, also known as dysbiosis, a condition associated not only with gastrointestinal disorders but also with diseases affecting other distal organs, such as the BBB. However, the interplay between pesticides, microbiota, the IB, and the BBB is still not fully explored. In this review, we first consider the similarities/differences between these two physiological barriers and the different pathways that link the gut microbiota and the BBB to better understand the dialogue between bacteria and the brain. We then discuss the effects of chronic oral pesticide exposure on the gut-microbiota–BBB axis and raise awareness of the danger of chronic exposure, especially during the perinatal period (pregnant women and offspring).

Keywords: gut-microbiota–BBB axis; barriers; pesticides; Chlorpyrifos; prebiotics; vulnerable population

1. Introduction

Given the sharp rise in the incidence of cancer, leukemia, inflammatory bowel disease (IBD), and neurological diseases, it is evident that human chronic exposure to pesticides is a real public health problem [1,2]. Since 1975, the World Health Organization (WHO) has classified families of pesticides as “hazardous substances” and has continued to classify them according to their dangerousness in the light of the latest knowledge [3,4]. Despite the effort to limit their use, pesticides are widely used throughout the developing world, and their demand is increasing due to the current system of crop production which prioritizes high agriculture yields [5]. Pesticides have generally been considered to be contributors to global food security and were originally designed to kill pests by interacting with the targets involved in vital functions (e.g., nerve signaling, metabolism, cell survival, or division). However, as the research in recent years has shown, they can have deleterious effects on human health (nontargeted organism) by modifying physiological mechanisms that are not specific to them [6,7]. To limit the entry of potential hazards and to protect itself from pathogens, environmental toxins, or neurotoxic molecules, the body has developed several barriers, including epithelial cell barriers (the intestinal barrier (IB)), the air–blood lung barrier, the blood–cerebrospinal fluid barrier (BCSF-B), and the blood–brain barrier (BBB), each displaying different barrier properties and cellular composition [8–10]. The IB and BBB play an important role by protecting the host against food, environmental contaminants,

and infections. The IB, located in the intestine's surface, is part of the first defense system between the external environment and the internal systems of our body [11]. This barrier is built from a single layer of epithelial and Paneth cells separating the gut lumen from the internal space, whereas the BBB is a selective barrier localized at the endothelial cells (ECs) constituting the brain microvessels, which separates the lumen of blood vessels from the central nervous system (CNS) parenchyma [12–14]. The IB and BBB are considered immunological and physical barriers [15–17]. Each barrier not only provides protection against invading pathogens but is also important for controlling the microenvironment of the tissue and, therefore, tightly regulates the movement of the molecules and ions between the cellular spaces [13,18,19]. These barriers have many similarities in their mechanisms of action despite providing defense in very different environments [20]. Unlike the BBB, the IB is constantly exposed to food antigens and contaminants and is colonized by a collection of bacteria and microorganisms' antigens of the microbiota. The gut microbiota (GM) is a real organ system that includes a diverse and complex population of microorganisms colonizing the digestive tract and having a symbiotic host's relationship that helps to maintain a dynamic metabolic and ecological balance [21]. In fact, the GM consists of more than 3 million genes compared to 23,000 genes in the human genome, making the microbiome crucial in many functions in the human organism's health and disease [22]. The neural, endocrine, and immune network of communication exists between the gut, microbiota, and brain. This axis of bidirectional communication, defined as the gut-microbiota-brain axis is essential in maintaining homeostasis of the gastrointestinal, CNS, and microbial systems (Figure 1) [23,24].

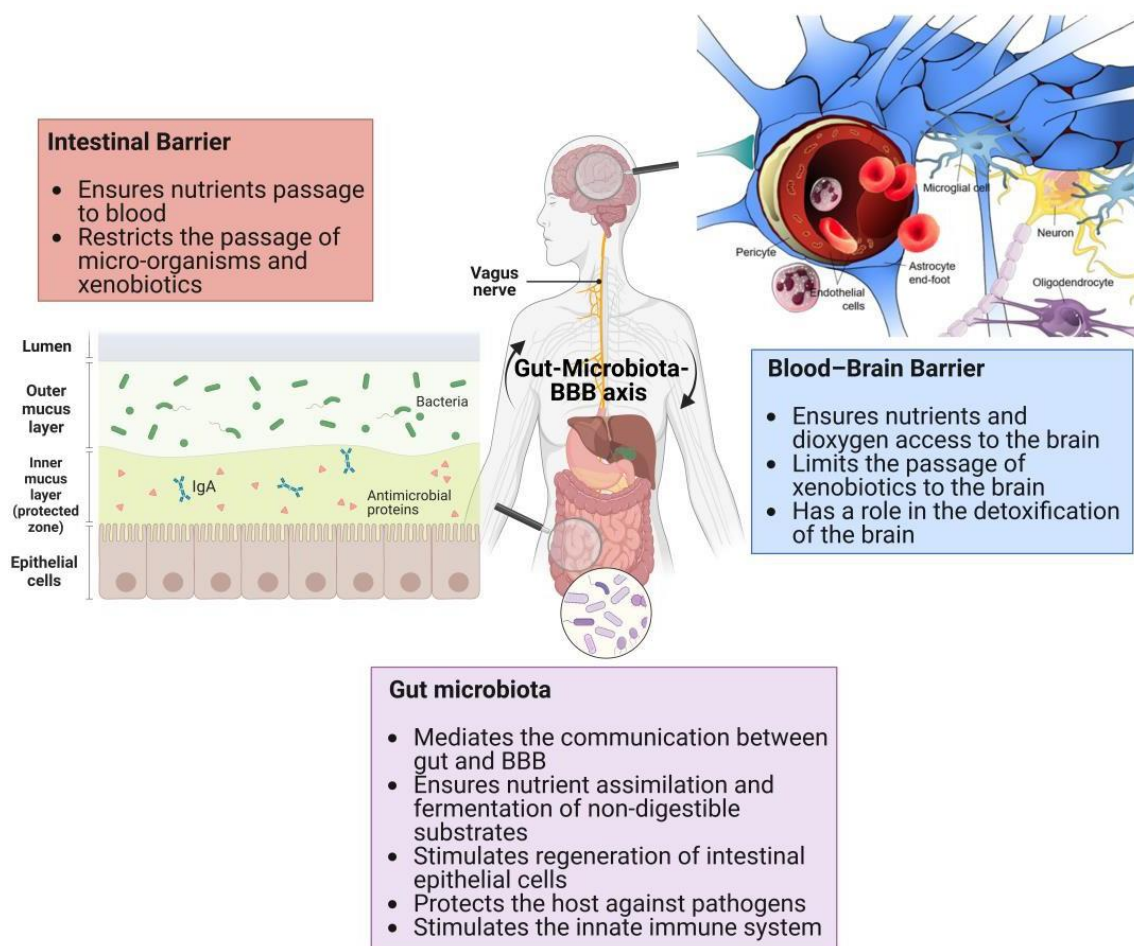


Figure 1. Gut-Microbiota–Blood–Brain Barrier Axis.

Under normal, healthy conditions, mucus and a tight barrier of epithelial cells confine most microbes to the gut lumen [12]. Daily exposure to contaminants, including pesticides, changes the structure and the balance of the GM (named gut dysbiosis or dysbacteriosis) in favor of potentially pathogenic bacteria [25,26]. Dysbiosis is defined as an imbalance in the GM and/or its functions due to the loss of beneficial microbes and the increase in pathogenic ones that might induce inflammation and immune dysregulation leading to an unhealthy outcome [27–29]. As a result, the alteration in bacterial metabolites modulates the IB permeability and thus generates an uncontrolled and permissive passage of not only proinflammatory agents (cytokines, interleukins, bacteria, and bacterial products) [30,31] but also bacterial neurotransmitters from the microbial environment and immune cells that can compromise intestinal and brain homeostasis by affecting the BBB integrity leading to inflammatory and neurological disorders [32,33]. The passage of viable bacteria of the gastrointestinal flora is through the barrier of the intestinal mucosa (the lamina propria) to the mesenteric nodes and then to normally sterile internal organs and is defined as “bacterial translocation” [26].

The link between pesticides and diseases is not limited to the dose we are exposed to but most importantly (1) the timing of the exposure (prenatal exposure, the first 1000 days of life) or “windows of vulnerability” of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) concept and (2) the duration of the exposure: a chronic exposure to a low dose or to the dose with no effect (No-observed-adverse-effect level: NOAEL) can have more of an impact on health than a short-term exposure to a high dose [26,33–36]. Therefore, understanding how the gut, microbiota, and BBB are affected by environmental factors such as pesticides is important for elucidating the way of preventing and treating bowel and brain pathologies.

Nowadays, the interplay between pesticides, the GM, and the BBB is still not fully explored. Consequently, to understand how the IB and BBB are affected following microbiota dysbiosis induced by pesticides, it is necessary to (a) acknowledge the structure and the function of these three “organs” as if they form one system which is the gut-microbiota-BBB axis and analyze how pesticides could impact this axis.

We will first discuss the similarities and the differences between the IB and the BBB. Then, we will focus on the current knowledge of the effects of pesticides on this axis and raise awareness of the danger of chronic exposure, especially during the perinatal period. Finally, we will briefly discuss whether prebiotics could counteract the effects of these xenobiotics.

2. Formation, Composition, and Role of Gut Microbiota

Most of the research on the GM assesses that microbial colonization of the human gut begins at birth but progressively evolves and is modified by surrounding factors, such as environment and diet [37]. The process of colonization of the gastrointestinal tract (GIT) is influenced by the type of birth, which means that microbial species of C-section neonates differ from those of vaginally born infants [38]. Advanced studies showed the presence of microorganisms in the meconium of individuals born by cesarean section and in the umbilical cord blood of newly born babies, which means that there is microbiota transmission from the mother to the fetus and thus the fetus does not live in a fully germ-free mother womb [21,39–41]. The GM is extremely complex, and its composition changes after the shift from breast-feeding to solid food and is continuously influenced by numerous host-related factors that are external (environment and diet: type of food and feeding habits) and internal (intestinal pH, microbial interactions, temperature, peristalsis, bile acids, intestinal secretions, and immune responses). At adulthood, the GIT contains a vast and complex microbial ecosystem of approximately 100 trillion microorganisms with more than 40,000 species of bacteria containing 100 times more genes than humans [42,43]. Most of these bacteria protect the gut epithelial cells against pathogens. Strict anaerobes mainly compose the GM and outnumber the facultative anaerobes and the aerobes by up to 100-fold [44,45]. Out of the four phyla populating the gut, two phyla, *Firmicutes*

and *Bacteroidetes*, appear predominant in the human GM [46,47]. Despite all the factors that influence the composition of the intestinal microbiota, the microbial community stays stable at the phylum level: the two phyla mentioned above are conserved in individuals and may only vary in their relative proportions at various stages in life [47–49]. However, on the spatial level of the GIT, the phyla distribution varies. Biopsy studies showed that the small intestine is enriched with certain members of the *Firmicutes* phyla and the colon with members of the phylum *Bacteroidetes* [50,51]. Variations also exist between intestinal sections. For example, the genera *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Ruminococcus* were all found in the feces, making the composition representative of the luminal community, whereas only *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Enterococcus* were detected in the mucus layer and epithelial crypts of the small intestine [46].

The GM is a major component of the digestive tract that stimulates the regeneration of intestinal epithelial cells and mucus production by goblet cells. It similarly has a role in nutrient assimilation and the fermentation of non-digestible substrates [29].

Host immunity maintenance depends on the gut microbial–host interactions because 70% of the immune system resides in the gut. The GM stimulates the innate immune system early in life leading to the maturity of gut-related lymphoid tissue and inspires acquired immunity by stimulating local and systemic immune responses, gut synthesis, and the metabolism of certain nutrients [52,53]. The GM nourishes the intestinal mucosa by producing short-chain fatty acids (SCFAs): acetic, propionic, and butyric acids [54]. Acetate

and propionate are produced by *Bacteroides thetaiotaomicron* (*Bacteroidetes* phylum), whereas butyrate is produced by *Clostridium tyrobutyricum* (*Firmicutes* phylum). A study showed

that SCFAs are able to increase the number and function of regulatory T cells (Tregs) in the gut [55]. SCFAs are also able to decrease BBB leakage: a study on monocolonized mice with single bacteria strain *Clostridium tyrobutyricum* or *Bacteroides thetaiotaomicron* showed a decrease in BBB permeability compared to germ-free mice. Moreover, when germ-free mice, having disorganized brain tight junctions (TJs), were colonized by the microbiota of pathogen-free mice, the integrity of the BBB was increased, proved by the increase in TJs expression: occludin and claudin-5 [56].

In addition to SCFAs, the GM produces many metabolites, such as lipopolysaccharides (LPS), trimethylamine (TMA), bile acids, and indoles. [57]. Some of these metabolites are beneficial such as indoles that regulate the IB function and immune response, and bile acids and TMA that maintain glycolipid homeostasis. Contrarywise, others are detrimental such as LPS which is an immune system disrupter and circulating uremic toxins derived from the digestion of dietary amino acids that have recently been shown to impair BBB integrity and alter brain activity (p-cresol sulfate and 4-ethylphenyl sulfate) [58,59].

3. The Structure and Functions of the Intestinal Barrier

As mentioned above, the IB refers to the barrier between the microbiota and the intestinal mucosa and is one of the largest boundary barriers between the body and its environment [60,61].

The IB constitutes a biochemical and physical barrier where millions of microbes and environmental antigens come in close contact with the host immune system. The IB provides an effective obstacle and becomes more selective at birth [62]. This barrier is made of a mucus layer that represents the first defense component of the IB, limiting the transport of potentially harmful antigens and microorganisms. The intestinal mucosa is composed mainly of mucus, highly glycosylated mucin proteins, defensins, Immunoglobulin A (IgA), and the inner lamina propria where regulatory T cells (Tregs) and resident dendritic cells maintain an anti-inflammatory environment by secreting an appropriate cocktail of cytokines [63,64]. This layer, essential in the maintenance of intestinal homeostasis, coats the interior surface of the GIT and acts as a physical barrier to bacteria and other antigenic substances present from the lumen to the lamina propria [63].

Despite its structural role, the mucus layer does not establish alone a significant barrier to transmucosal water or solute flux. The IB depends on the epithelial cells that are the bricks of the intestinal physical barrier. The latter is associated with absorptive enterocytes, goblet cells, enteroendocrine cells, Paneth cells, and microfold cells [65]. Some of these cells release neuro-immunomodulatory mediators (e.g., enterochromaffin cells) such as serotonin, while others such as Paneth cells release anti-microbial peptides [66]. These cells all together form a continuous and polarized monolayer separating the gut lumen from the internal space.

The passage of most hydrophilic solutes through the adjacent epithelial cells is highly restricted. Indeed, the paracellular route of solutes, ions, and nutrients is regulated through the presence of junctional complexes providing a physical barrier to unwanted and potentially damaging molecules [18]. The function of the TJs is important in intestinal health as a defective IB leads to diseases, including bacterial enteritis, IBD, and irritable bowel syndrome (IBS) [67].

From apical to basal, the intercellular space is sealed by a complex of junctions, including TJs, adherens junctions (AJs), and desmosomes [18]. TJs consist of transmembrane proteins (e.g., claudin and occludin) that seal the intercellular space and peripheral membrane proteins (e.g., zonula occludens (ZO)s and cingulin). The function of the TJs is determined by the expression level, distribution, and phosphorylation of the TJs' proteins [68].

The claudin-2, -3, -4, -7, -12, -14, and -15 isoforms are expressed in the epithelium of the IB [69,70]. Some of these claudins (e.g., claudins 3, 4, 7, and 14) form a selective barrier to macromolecules and ions, whereas others (claudins 2, 12, and 15) are pores to ions and water. Claudin 5, on the other hand, is less expressed in epithelial cells than in endothelial cells and its role as the gatekeeper of the permeability of the IB is less important than that of the BBB [71].

Occludin, adherens junctions, and claudin molecules are linked to the cytoskeleton by zonula occludens (ZO)s. The functions of ZO)s are still under investigation. Most ZO)s are known to regulate the assembly as well as stabilization of TJs [72]. Nevertheless, the role of ZO-1 in the TJs is still unclear. Unlike endothelial cells, recent studies found that ZO-1 is not essential for the barrier function and is not required for mucosal organization but for its repair [73]. Though the paracellular barrier properties of the IB are quite conserved throughout the whole intestine, the transcellular barrier properties of the IB differ according to the section of the intestine that is considered. The efflux of xenobiotics and their conjugates from the epithelial cells occurs through diverse membrane transporters such as the ATP-binding cassette (ABC) proteins such as P-gp (Glycoprotein P) and MRP1 and 2 (Multidrug-Resistant Protein). In the BBB, they are recognized for their ability to modulate the absorption, distribution, metabolism, secretion, and toxicity of xenobiotics. Despite the apical distribution on enterocytes, little is known regarding how ABC transporters interact with the GM. Recent studies reported that their expression is influenced by gut microbes (pathogenic or otherwise) (Figure 2) [74].

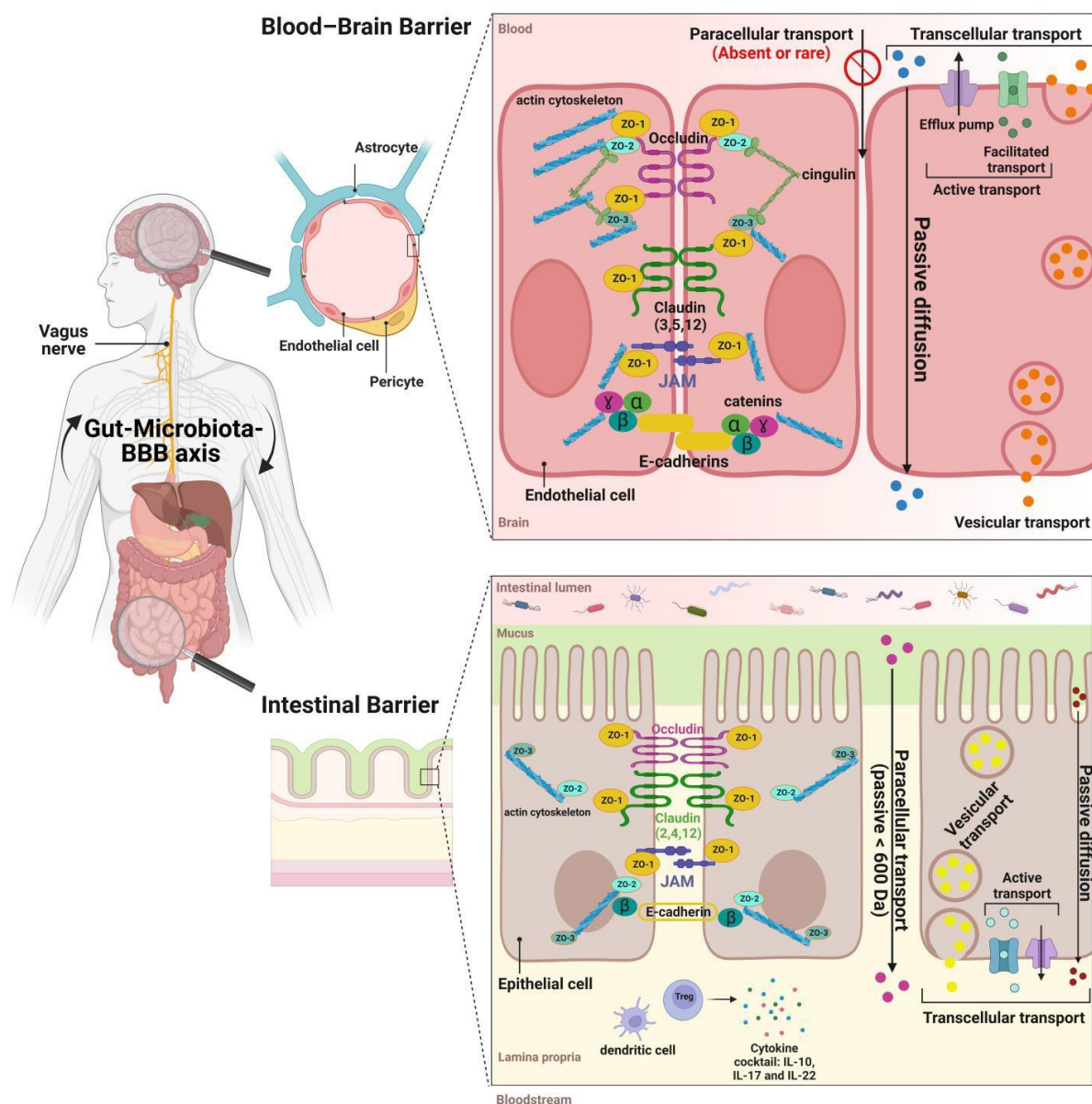


Figure 2. Similarities and differences between the intestinal barrier (IB) and blood–brain barrier (BBB). The IB is made up of epithelial cells separating the gut lumen from the internal space, whereas the BBB is formed by endothelial cells (ECs) lining the blood vessels separating lumen of blood vessels from the central nervous system (CNS) parenchyma. The first defense component of the IB, separating the microbiota from the epithelial cells, is the intestinal mucosa: mucus layer composed of highly glycosylated mucin proteins, defensins, Immunoglobulin A (IgA), and the inner lamina propria where T-reg (regulatory T cells) and resident dendritic cells maintain an anti-inflammatory environment by secreting an appropriate cocktail of cytokines. Each barrier tightly regulates the movement of molecules and ions between the cellular spaces through paracellular (rare in the BBB) and transcellular transports (diffusion, vesicular, and active). The active transport is ensured by efflux pumps and specific transporters. Thus, these two barriers are considered physical, immunological, and dynamic barriers protecting the host against food contaminants and pathogens. The molecular composition of BBB endothelial tight junctions, ensuring paracellular passage restrictions, shows remarkable similarities to those in epithelial cells (but more stringency at the BBB) as they are formed by strands of occludin, claudin molecules, and JAM (junction adhesion molecules) that are linked to the cytoskeleton by zonula occludens (ZO-1, 2, and 3) as well as intracellular proteins (e.g., catenin).

4. The Structure and Functions of the Blood–Brain Barrier

The BBB is a barrier localized at the level of the brain microvasculature. It is the major brain barrier in terms of the length, close to 650 km, and the surface, 10–20 m² [75–77]. The BBB is formed by the brain endothelial cells (ECs) lining the brain microvessels.

ECs, pillars of the BBB, are in close contact with the brain pericytes sharing the same basement membrane (BM) layer and are both surrounded by a continuous sleeve of astrocytic feet. Together, with microglia and neurons, they form the neurovascular unit (NVU) and cooperate and intercommunicate to ensure the brain's health [13,78]. Compared with other endothelial and IB epithelial cells, the morphology and functional properties of ECs are different as they lack fenestrations to limit the movement of molecules, have a low rate of vesicular transport to prevent the unspecific transport of large hydrophilic molecules to the CNS, are enriched in mitochondria, and have very few vacuoles of endocytosis [70,79–81]. To restrict the passage between the adjacent endothelial cells and protect the CNS from exposure to potential harmful molecules, ECs are tightly sealed through junctional complexes. The molecular composition of the BBB shows remarkable similarities to those of IB cells as they are formed by strands of occludin, JAM (junctional adhesion molecules), and claudins molecules that are linked to the cytoskeleton by ZOs (ZO-1, 2, and 3) which are membrane-associated guanylate kinases [21]. Claudin 5 is critical to the BBB formation, as claudin 5-deficient mice show a size-selective leakage of the BBB, whereas claudins 1, -3, and -12 have also been identified at the IB [70].

In contrast to IB cells, the TJs of the BBB are localized only at the apical surface of the non-fenestrated endothelium, sealing the paracellular route and making the ECs' penetrance to the intravascular materials lower than peripheral endothelial cells [82].

The junctional complex contributes to the low paracellular permeability of the BBB by limiting the paracellular movement of endogenous and exogenous compounds. Thus, TJs are particularly important for BBB function and their loss can greatly increase its permeability, resulting in inflammation and neuropathology [83].

The BBB is an even more selective barrier than the IB. To cross the BBB, xenobiotics can diffuse passively through the membrane of ECs (transcellular route) if they are lipophilic or will be taken up by transporters. Indeed, ECs express specific transporters and receptors at the apical (blood side) and basolateral (brain side) membranes to ensure efficient nutrient supply and brain waste elimination, such as the glucose transporter (GLUT1), the mono- carboxylate transporters (MCT), and the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) that participate in the transport of glucose, ketone bodies, and lipoproteins, respectively [19,84]. In addition, ECs express several members of the ATP-binding cassette (ABC) family, such as ABCB1 (or P-gp), ABCC1 (or MRP1), and ABCG2 (or BCRP: Breast Cancer-Resistant Protein) that all impede the penetration into the brain of various potentially toxic compounds and prevent their CNS accumulation (Figure 2) [85,86]. The functional activity of these transporters increases or decreases under the influence of internal and external factors including pesticides with damage to vessels and the CNS [87–89].

5. Gut-Microbiota-BBB Communication

Many complex and bidirectional interaction mechanisms exist between the gut and brain: neural, metabolic, endocrine, and immune pathways. This complexity of interactions is summarized in the term “gut-brain axis” [90].

The neural bidirectional communication network with the GM mainly includes the enteric nervous system that controls the gastrointestinal system and the vagus nerve that allows the bidirectional signaling between the gut and the CNS [23,91]. The endocrine pathway involves a connection between the GM and the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis through hormones. Both neural and hormonal lines of communication combine to allow the brain to influence intestinal activities and vice versa under the influence of the GM [92].

Another intercommunication exists through the bloodstream and is possible because, beyond the mucus and intestinal epithelial barrier, the gut is equipped with a gut vascular barrier (GVB), which acts as a gatekeeper to control the access of molecules and microorganisms in the systemic blood circulation [93,94]. This communication is mainly mediated by microbiota. The GM sends signals to the brain and vice versa by stimulating the release of intestinal hormones or by transforming dietary components into several substances including the amino acids, neurotransmitters (serotonin, tryptophan, and gamma-amino-butyric acid), and vitamins that influence the metabolism and the immune system, which in turn influence the integrity of the BBB and brain function [95,96].

In addition, the GM can affect the BBB through the regulating secretion of inflammatory factors and producing systemic circulating metabolites such as SCFAs by the fermentation of dietary fibers and LPS [97]. SCFAs can translocate from the intestine to the brain through the bloodstream and cross the BBB [98,99]. Some studies have reported various effects on immune cells, including Treg cells [55,100] or T effector cells and macrophages [99]. Through these metabolites and other molecules, the microbiota regulates the innate immune system and modulates the structural and functional integrity of the IB and BBB. A study showed that fetal BBB maturation is delayed in germ-free (GF) pregnant mice and the expression of TJ's proteins claudin-5 and occludin was reduced [56]. These findings highlight the importance of the GM in a healthy barrier's phenotype and may explain how disorders can be associated with a barrier's physiology disturbance.

In fact, recent research has shown that GM disorders (dysbiosis and/or bacterial translocation) are often associated with a leaky IB and BBB disruption accompanied with inflammation [101,102]. Ancient medical texts referred to inflammation as a redness, warmth, pain, and functional loss, while currently it is defined as the immune system's way of eliminating foreign substances and endogenous stress signals. The resolution of systemic inflammation results in the successful clearance of pathogens, but untreated or repeated acute inflammation could worsen the condition or transform into chronic systemic inflammation characterized by proinflammatory biomarkers [103]. In other terms, a plethora of secreted proinflammatory cytokines (IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF α), or INF- γ),

C-reactive protein (CRP) [104], lipoteichoic acid from Gram-positive bacteria, (LPS) from Gram-negative bacteria, and double-stranded RNA from viruses will translocate, cross the IB, and reach the blood [32,105], affecting the arrangement and expression of TJs and the expression of efflux pumps and transporters of the BBB, thus impairing the barrier's integrity. Specifically, in the case of a microbiota dysbiosis scenario, Long et al. explain that local intestinal inflammation induced by dysbiosis lies in the communication between the host and bacteria [101]. LPS-mediated communication is possible because of its recognition by the TLRs of monocytes, macrophages, and microglia at the level of both barriers, enhancing the secretion of proinflammatory cytokines. LPS activate the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathway by binding to TLR4 [97,106]. It is this activation that is responsible for the secretion of proinflammatory cytokines which leads to systemic inflammation [101]. The resulting cocktail of proinflammatory cytokines (TNF- α and interleukin (IL)-1 β and IL-6) in the bloodstream in addition to the LPS disrupt the IB and BBB (increase in the barriers' permeability) and promote α -synuclein deposition [101,107,108]. This increase in permeability can be associated to TJ's modulation mediated by released cytokines. TNF- α is a cytokine that has been reported to be involved in many intestinal diseases and can induce altered barrier function and increased vascular permeability. TNF- α decreased the expression of the TJ's proteins, including ZO-1, occludin, and claudin-1, and increased the claudin-2 expression [70]. Notably, BBB dysfunction and leakage threaten brain safety, leading to brain inflammation and opening the path to the development of neurodegenerative diseases [77].

Gut dysbiosis is considered to be an important environmental factor responsible for the loss of barriers' integrity. Any disruption of the microbiota by diet and food contaminants leading to dysbiosis, translocation, and eventually inflammation will affect the integrity of the IB and BBB. Microbiota disorders and pathways lead to inflammation and the break-down of both barriers, particularly in the case of chronic exposure to pesticide residues.

6. Pesticide Residues Exposure and Effects on the Gut and BBB

As previously mentioned, one important connection between the gut and the brain is the microbiota. This means that any dysregulation of the microbiota (named dysbiosis) can affect the two parts of this axis. Oral-exposure substances that can disrupt microbiota can be in diet, drugs, antibiotics, and, most importantly in this review, pesticide residues.

Pesticide residues are food and water contaminants. Some of them alter the composition of the GM and disrupt and cross the IB [25,109,110]. They are defined by the Food and Agriculture Organization (FAO) as any substance or mixture of substances intended for pre-venting, destroying, or controlling any pest, including vectors of human or animal disease, unwanted species of plants or animals, causing harm during or otherwise interfering with human activities (production, processing, storage, transport, marketing of food, agricultural commodities, etc.) [111]. These substances are classified based on various criteria, such as the targeted pest organism type (fungicide, herbicide, insecticide, etc.), chemical composition (e.g., synthetic organic insecticides: organochlorines, organophosphates, carbamates, and pyrethroids), and mode of entry in the body [3,112]. The mode of action of pesticides targets the physiological systems of the pests they kill, but this can result in poisoning nontarget species, such as humans (phylogenetic similarities in digestive, respiratory, and nervous systems). Since the beginning of the 20th century, the use of pesticides and fertilizers is intensive to ensure large agriculture production to adapt with demographic growth. The most frequently used chemical families in agriculture are the synthetic organic insecticides mentioned above and triazines [5]. This means that we are not only exposed to one or two but to a mixture of environmentally persistent pesticides daily. Thus, the assessment of the impact of these substances nowadays should consider the chronic cumulative effect as well as the cocktail effect [113–115]. The concept of metabolization (biotransformation by microbiota bacteria and liver detoxification enzymes) is also a point of interest because the pesticide metabolite can be more harmful than the parent compound, indicating a metabolic activation. Generally, oxon-type intermediate metabolites are more hazardous than their parent pesticide. Organophosphates oxon-metabolites are an example of more toxic metabolites than the corresponding pesticide: Chlorpyrifos-oxon (CPF-oxon) is more potent than Chlorpyrifos (CPF) itself, same as for paraoxon and parathion [2,116,117]. The neurotoxic effects and impact on the gut-microbiota-BBB axis of the most detected pesticides in food (according to the EFSA European Food Safety Authority) [118] are detailed in Table 1. This review details the effects of the most used organophosphate insecticide, CPF, on the gut-microbiota-BBB axis.

Table 1. Neurotoxic effects and impact of pesticides on the gut-microbiota-BBB axis. AChE: acetylcholinesterase; BBB: blood–brain barrier; C57BL/6: C57 black cellCaE: carboxylesterase; ChE: cholinesterase; CPF: Chlorpyrifos; IB: intestinal barrier; IL: interleukin; IMZ: imazalil; IFN- γ : Interferon gamma; ppm: parts per million; Lcn-2: Lipocaline 2; N2a: mouse neuroblastoma cells; PC12: rat Pheochromocytoma cells; SHIME: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem; TEER: transendothelial electrical resistance; TJs: tight junctions; TNF- α : tumor necrosis factor; TRPC4: transient receptor potential canonical channels; ZO: zonula occludens. $\downarrow$ and $\uparrow$ symbols refer to decrease and increase, respectively.

Pesticides	Effect on Gut	Effect on Microbiota	Effect on BBB	Neurotoxic Effect	References
Organophosphates					
Chlorpyrifos (CPF)	a. $\downarrow$ in epithelial thickness of ileum and colon of rats after exposure to 1 mg/kg/day of CPF $\downarrow$ of tight junction gene expression of the intestinal barrier and $\uparrow$ of proinflammatory cytokines	c. Exposure to 1 mg/kg/day of CPF-induced (1) microbial dysbiosis in pregnant rats and offspring, a $\downarrow$ in potentially beneficial flora and an $\uparrow$ of the potentially pathogen one, and (2) bacterial translocation to sterile organs	d. Altered gene expression levels of claudin 5, ZO-1, and TRPC4 genes disrupting the barrier integrity in an in vitro BBB model	e. Exposure to 1.5 (low dose) and 3 (high dose) mg/kg/day of CPF-induced inhibition of cholinesterase in rats in a dose-related manner f. Inhibition of carboxylesterase (CaE) and cholinesterase (ChE) activities by 43–100% in an vitro BBB model treated with (0.1 to 10 μ M) of CPF	a. [31,34,35] b. [119–121] c. [26,30,34,122] d and f. [87] e. [123]
	b. $\downarrow$ of TJs gene expression of the IB (Caco-2/TC-7 model treated with SHIME supernatant exposed to 3.5 mg of CPF for 30 days)			g. Exposure of pregnant rats to 1 and 5 mg/kg/day of CPF-induced inhibition of AChE of juvenile and adult offspring leading to high sleep apnea index	g. [124]
Diazinon		h. Exposure to 4 ppm for 13 weeks in drinking water had an impact on bacterial populations and composition of <i>Lachnospiraceae</i> , <i>Ruminococcaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> , and <i>Erysipelotrichaceae</i> in male mice		i. Exposure to 0.5 and 2 mg/kg/day induced long-lasting alterations in cognitive function in adolescence and extending into adulthood of rats	h. [125–127] i. [128]
Malathion		j. $\downarrow$ in bacterial populations (depletion of 4 genera) in male mice exposed to 2 mg/mL in drinking water for 13 weeks	k. $\downarrow$ in the TEER in two BBB in vitro models treated with malathion (10^{-3} to 10^{-8} M)	l. Induces neurotoxicity through ChE inhibition and non-cholinergic mode: apoptotic cell death by targeting mitochondria in N2a neuroblastoma mouse cells (at 0.25, 0.5, or 1 mM for 8 h)	j. [125,127] k. [129] l. [130]

Table 1. Cont.

Pesticides	Effect on Gut	Effect on Microbiota	Effect on BBB	Neurotoxic Effect	References
Herbicides					
Glyphosate	m. ↑ in proinflammatory cytokines transcriptomic expression (IL-1β, IL-6, and TNF-α) after exposure to 5, 50, and 500 mg/kg for 35 days in male rats	n. ↓ in the relative abundance of <i>Firmicutes</i> and <i>Lactobacillus</i> but increased <i>Fusobacteria</i> in male rats exposed to 500 mg/kg for 35 days treatment of the BBB model	o. ↑ in barrier permeability to fluorescein (at 1 and 10 μM of glyphosate) and ↓ in claudin-5 fluorescence intensity (at 100 and 1000 μM) after 24 h	p. 24 h of treatment with high doses of glyphosate (100 μM) can affect neurons metabolic activity	m and n. Q. [110] o and p. [131]
Fungicides					
Imazalil	q. ↑ in a colonic inflammation biomarker (Lcn-2) ↑ in mRNA levels of TNF-α, IL-1β, IL-22, and IFN-γ in the colon after exposure to 100 mg/kg bw/day IMZ for 28 days in mice	r. ↓ in <i>Bacteroidetes</i> , <i>Firmicutes</i> , and <i>Actinobacteria</i> in the colon after exposure to 100 mg/kg bw/day IMZ for 28 days in mice		s. ↑ in oxidative stress ↑ basal calcium ions Ca ²⁺ (indicating inhibition of depolarization-evoked calcium influx) in an in vitro model of rat dopaminergic PC12 cells treated with 100 μM of IMZ	q and r. [25] s. [132,133]
	t. 15 weeks administration of IMZ at doses of 0.1, 0.5, and 2.5 mg/kg/day to C57BL/6 mice led to:			u. 48% inhibition of AChE by IMZ (at 500 μM, in vitro enzymatic inhibition assays)	t. [134] u. [135]
IB dysfunction		gut-microbiota dysbiosis			

1.1 Chlorpyrifos (CPF)

1.1.1 CPF Utilizations until 2022

Organophosphorus pesticides are extensively used worldwide because of the wide range of pests they kill, the broad spectrum of applications (food trees, wheat, corn, almonds, tea, etc.), and their persistence in soil [2,136]. Chlorpyrifos (CPF) is the most commonly used thionophosphorus organophosphate insecticide, available on the market at a low price since 1965, especially in France, one of the first pesticide consumers in Europe. In 1998, only one study was sufficient for the European Union (EU) to give use approval of CPF, but it took more than hundreds of studies showing neurotoxic, metabolic, and endocrine effects to make the decision in 2019 limiting its use. Nonetheless, CPF production has not been banned. Therefore, pollution in the environment is still present. After the ban of CPF use in the EU by the EFSA, except for the culture of spinach in France, the EPA (United States Environmental Protection Agency) made a recent regulatory decision banning CPF for food uses in the United States in February 2022 (EPA final rule) [137]. However, on one hand, it is still allowed for mosquito control, on tobacco, on plantations not for feed purposes, and on food destined to export when it complies with foreign purchaser specifications (updates on CPF uses in 2022, Iowa State University) [138]. Therefore, these limitations do not prevent the accumulation of CPF in the soil and then in water and thus its uptake by aquatic species and its entry into the food chain of human beings [139]. And still, many other regions of the world including China and India continue allowing CPF on crops. On the other hand, it has been demonstrated by many studies on the biotransformation of CPF in soil that its half-life has a very wide range, from 360 days to 17 years, because its fate depends on the initial concentration used on plants and the biodegradation rate. This means that even after limitations, measures should be taken concerning the control of CPF residues in soil, local and imported food, and most importantly in human blood or urine. In addition, strict measures should be adopted in countries where residents have easy access to this dangerous pesticide: in Iran, CPF residues are found in the milk of breast-feeding mothers, their urine, and even their children's urine [140]. A total of 92% of these mothers confirmed pesticides' house use, an activity banned since 2001 in the US [106]. Rathod and Garg reported a scenario in India where the commonest method of suicide (40.5%) is organophosphorus compound (OPC) intake [2,141]. Therefore, limitations are essential in these countries to protect residents and their future generations.

1.1.2 CPF Mechanism of Toxicity and Toxicokinetic

Chlorpyrifos is absorbed by all routes of exposure. Urinalyses of exposed human volunteers indicate that approximately 70% is absorbed by the oral route [2,142]. After CPF exposure and then distribution throughout the body, cytochrome P450 (CYP) in the liver metabolizes CPF, replacing the sulfur group with oxygen, to CPF-oxon, a metabolite that is more toxic than CPF itself. The detoxification of CPF-oxon consists of oxidase enzymes hydrolyzing it to diethylphosphate (DEP), diethyl thiophosphate (DETP), and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) [2]. TCP is a specific metabolite of CPF, whereas DEP and DETP can be detected after exposure to other organophosphates [143,144]. It is the metabolic bioactivation to CPF-oxon that leads to the irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE) preventing the breakdown of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter that ensures nerve cells communication. The accumulation of ACh in the synaptic cleft overstimulates the neuronal cells, leading to a collapse in the nervous system of insects (National Pesticide Information Center) [145]. Similarly, in higher vertebrae, in particular humans, CPF has a cholinergic effect and has been demonstrated to have a plethora of non-cholinergic effects.

1.1.3 CPF Biotransformation by Intestinal and Soil Bacteria

The research on xenobiotics degradation in the human body mostly focuses on detoxification by CYP and other liver enzymes, but based on the literature, a minority of the studies focus on their degradation by intestinal microorganisms and specifically bacteria. A 2013 study by Harishankar and colleagues found that 70% of CPF was degraded to TCP by

Lactobacillus fermentum, 61% to CPF-oxon by *Lactobacillus lactis*, and 16% of CPF to CPF-oxon and DEP by *Escherichia coli* [146]. Recently, insect experimental studies were conducted to investigate the fate of pesticides by an intestinal microorganism [147]. A 2021 study assessed the biodegradation of organophosphorus including CPF by isolating insect gut microbial species. Four potential bacterial endosymbionts such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas putida*, and *Pseudomonas cereus* used CPF as a unique source of carbon and energy for their growth and enzymatic function. They found that *Pseudomonas cereus* and *Pseudomonas putida* have more potential to degrade the CPF [148]. Similarly, in soils, the researchers suggested that CPF is totally degraded by microorganisms and especially by *Pseudomonas putida* MB285 to form the primary products TCP and DETP, which are further decomposed into non-toxic metabolites, such as CO₂, H₂O, and NH₃ [149]. *Pseudomonas* is a diverse genus with multiple degradation pathways. It was reported that *Pseudomonas putida* MAS-1 had the highest degradation efficiency for CPF in *Pseudomonas* genus, with a 90% degradation rate within 24 h [150]. Furthermore, another study published in 2008 reported that different bacteria contribute to the biodegradation of CPF in five aerobic consortia, based on antibiotic resistance survival and REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction). The results illustrated that 75–87% of the CPF was degraded to TCP after 20 days of incubation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescence*, *Bacillus subtilis*, *Brucella melitensis*, *Klebsiella* sp., *Bacillus cereus*, and *Serratia marcescens*. However, the results also showed that the TCP disappeared after 30 days of incubation [151]. A mini review published by Supreeth in 2017 evaluated the biotransformation of CPF and endosulfan by bacteria and fungi and discussed the aftereffects of their transformed byproducts (metabolites) [136]. The degradation of CPF to TCP was executed by different bacteria species, *Enterobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Sphingomonas* sp. [152], *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella* sp., *Serratia marcescens* [153], *Bacillus subtilis* *inaquosorum* strain KCTC13429, *B. cereus* ATCC 14579, and *B. safensis* F0-36b [154], and to CPF-oxon 3,6-Dihydroxypyridine-2,5-dione and DETP by *Pseudomonas putida* (NII 1117) *Klebsiella* sp. (NII 1118) *P. stutzeri* (NII 1119), *P. aeruginosa* (NII 1120) [155], and *Ralstonia* sp. Strain T6 [156].

1.1.4 CPF Effects on Gut-Microbiota-BBB Axis

As the gut and microbiota have an impact on the absorption and metabolization of pesticides, these pesticides can have serious effects on all parts of the gut-brain axis. Prenatal pesticide exposure studies detected parent molecules of organophosphates and/or their metabolites, CPF in particular, in meconium [157–160]. In fact, meconium has become a biomarker of in utero pollutants exposure. At this stage of rapid growth and development, especially of the brain, humans are more vulnerable and sensitive to the toxic effects of pesticides [161,162]. The message behind these analyses is that even before birth, which means before gut microbial colonization, we are exposed to CPF, which seems to cross the placental barrier. In addition, considering the oral route, before reaching the brain to inhibit acetylcholinesterase, the first organ to encounter CPF or any food contaminant is the digestive tract. Thus, it is necessary to investigate the organophosphate effects on the intestinal tract. Working on the rat offspring NOAEL of 1 mg/kg/day, Joly et al. studied the effect of 1 mg/kg/day or 5 mg/kg/day of CPF perinatal exposure on the GM of the rats' progeny at two developmental time points: weaning (D21) and adulthood (D60) [34]. Their results show that CPF exposure induces microbial dysbiosis: a decrease in *Lactobacillus* spp. counts in the ileum, cecum, and colon as well as a decrease in *Bifidobacterium* spp. at D21 in the ileum and D60 in the colon, and an increase in *Clostridium* spp. and *Staphylococcus* spp. counts in the cecum and colon at D21. This means that CPF exposure reduces potentially beneficial bacteria and increases potentially pathogenic ones. The epithelial thickness of the ileum and colon was decreased by CPF treatment. Because the first study was based on classical microbiology tests, they researched further to identify more specifically intestinal bacteria by MALDI-TOF-MS and investigate bacterial translocation from intestinal segments to sterile organs [30]. By molecular typing, they were able to confirm the translo-

cation of *Staphylococcus aureus* to adipose tissues, kidney, and Peyer's patch from 12.5% of CPF-exposed rats' intestinal segments and a 5% translocation of *Enterococcus faecalis* to the liver. This is logically explained by the increase in gut permeability induced by the decrease in ZO-1 and claudin 4 transcriptional expression in the ileum and colon, especially on D21 [62]. CPF exposure of an in vitro artificial human intestine (SHIME®) combined with a Caco-2/TC-7 model was associated with a decrease in the tight junction gene expression, occludin and ZO-1, and an increase in the proinflammatory chemokine interleukin-8 (IL-8) [121]. Zhao et al. also confirmed abnormal intestinal permeability in CPF-exposed mice and reported microbiota dysbiosis (a decrease in *Lactobacillaceae* and *Firmicutes* and an increase in *Bacteroidaceae* and *Bacteroides*) and alterations in the metabolism of SCFAs that led to intestinal inflammation [109]. This is an expected result because CPF treatment alters the microbial community that produces these metabolites. In addition, an analysis of serum showed an increase in LPS by CPF treatment. J. W. Li and colleagues showed that chronic exposure to 0.3 mg CPF/ kg body weight/day induced a significant increase in TNF- α and IL-6 in the serum of exposed rats [163]. These observations might explain the alterations in the functional integrity and structure of the BBB by CPF, highlighted by Parran et al. who worked on an in vitro BBB model (bovine endothelial cells and neonatal rat astrocytes) [87]. Another study on an in vitro BBB model (rat brain endothelial cells and neonatal rat astrocytes) showed that the short-term CPF treatment at low concentrations alters the expression levels of the claudin 5, ZO-1, and TRPC4 (transient receptor potential canonical channels) genes, disrupting the BBB integrity (TRPC regulates the calcium influx that modulates the paracellular permeability of the endothelial cells of the BBB) [88]. The claudin 5 gene is the main tight junction gene involved in the BBB tightness and ZO-1 ensures the support to the TJs' architecture [164,165]. Thus, CPF targets the most important actors of the BBB integrity. Because the exposure to pesticides is often accompanied with saturated fats and refined sugars (an unbalanced diet based on fast food and processed food), other studies assessed the impact of the association of CPF to a High Fat Diet (HFD) on intestinal microbiota and the IB. Guibourdenche and colleagues confirmed that the chronic perinatal exposure to the NOAEL dose of CPF alone induced a decrease in transcriptional TJs expression and also demonstrated an increase in proinflammatory cytokines and is aggravated by the association to an HFD [31,122]. These experimentations all together point to the impact of CPF on the entire gut- BBB axis even though its main mechanism is the inhibition of acetylcholinesterase in neurons. Further investigations are necessary to identify molecular pathways that explain the barriers' disruption by organophosphates.

1.1.5 CPF Molecular Pathways Underlying Its Effects

In parallel to studies analyzing the effects of organophosphates on the gut-brain axis, there are several studies investigating the molecular pathways associated to them. It has been demonstrated that organophosphates induce apoptosis by affecting signaling molecules, including c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK), p38 MAP kinase, and extracellular signal regulated protein kinase (ERK1/2) [166,167]. ERK1/2 is activated by neurotrophic factors and growth factors, whereas environmental stresses such as reactive oxygen species (ROS) activate JNK and p38 MAP kinases. The activation of JNK and p38 MAP kinases induces apoptosis, while the activation of ERK1/2 is protective against it [168]. In fact, CPF increases JNK, ERK1/2, and p38 MAPK phosphorylation [169]. It is known that mitogen-activated protein kinases (MAPKs) regulate matrix metalloproteinases (MMPs). MMP9 is regulated by ERK1/2 [170]. MMP9 activation yet increased the IB permeability in a Caco-2 in vitro model [171]. MMP9 upregulation leads to BBB leakage as well, through the rearrangement and/or degradation of the tight junctions [172,173]. Moreover, MAPKs have a role in the inflammatory response. Interestingly, CPF can upregulate cyclooxygenase 2 (COX-2) through MAPK activation [169]. In addition, CPF upregulates inflammation- related genes and the protein level of NF- κ B and TNF- α [174] which in turn can deteriorate

the BBB permeability [84]. A possible explanation for the CPF implication in these pathways is as follows: CPF increases NADPH oxidases (NOXs) and superoxide levels which increase ROS signaling and oxidative stress in cells [175]. The increase in ROS signaling induces, on one hand, the upregulation of TNF- α and NF- κ B and, on the other hand, the increase in the ASK1 expression responsible for the activation of JNK upregulation which is one of the MAPKs that regulates MMPs.

7. Beneficial Modulation of the Gut-Microbiota-Brain Axis

Recent studies on pesticide effects are focusing on a new concept: the recovery. In fact, a study of the effect of different doses of imazalil on mice GM evaluated the time of recovery after 2 and 15 weeks of exposure. They found that 30 or 45 days after impregnation with this fungicide, the bacterial composition at the phylum level recovered to the control level [134]. This highlights the fact that a change in the microbiota composition is flexible and tends to regain balance. In addition, new clinical trials indicated that the gut-microbiota-brain axis pathways and mechanisms are prone to dietary modulation and are of vital interest in clinical nutrition. As a matter of fact, dietary interventions and supplementation with probiotics and prebiotics can reshape the bacterial composition and are now administered as “psychobiotics” to treat neurological disorders because of their beneficial effects on the brain [176]. This means that by reshaping the GM, the whole gut-microbiota-BBB axis is positively modulated. The concept of probiotic use in the modulation of gut microflora was initiated in the 19th century by Elie Metchnikoff who theorized that “health and longevity could be achieved by manipulating intestinal microflora, i.e., replacing harmful microbes with beneficial microbes” while prebiotics were introduced by Gibson and Roberfroid in 1995 [177].

Their supplementation is now considered a promising approach that alleviates the negative effects of food contaminants [178]. In effect, bacterial strains that are considered probiotic strains (mostly *Lactobacillus* strains) can bind to xenobiotics and reduce their toxicity (through biotransformation) and the amount absorbed by the host [179]. *Lactobacilli* spp. are known to have the highest anti-inflammatory effects [52]. To exert their beneficial roles, probiotic strains need substrates. Prebiotics partially provide probiotic strains with substrates that are “nondigestible food ingredients which selectively stimulate the growth and activity of beneficial bacterial species already implanted in the colon, and thus improve the health of the host” [180]. Prebiotics are fructo-oligosaccharides (FOS) such as inulin, galacto-oligosaccharides (GOS), trans-galacto-oligosaccharides (TOS), and resistant starch which can be found in many fruits, vegetables, grains, and milk [181,182].

Arabinoxylo-oligosaccharides and inulin induced an increase in some SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) and a shift in the microbial composition from *Firmicutes* to *Bacteroidetes* [183]. Similarly, Sialyllactose (isolated from milk) and GOS induced the differentiation of the epithelial cells in the Caco-2 model, the modulation of the microbial composition (an increase in *Bacteroides* and *Bifidobacteria*), and consequently the production of SCFAs [184]. In fact, the fermentation of prebiotics by gut bacteria produces SCFAs which can reach the bloodstream by diffusing through gut enterocytes and have beneficial effects on the host [181]. In effect, an in vitro study linking the Caco-2 model and SHIME demonstrated that arabinogalactan and FOS decreased proinflammatory cytokines (IL-6 and IL-8), increased the anti-inflammatory cytokine IL-10, and improved the gut barrier permeability (the TEER measurements of the Caco-2 model) [185]. These findings empha-

size the direct effect of prebiotics on IB function through the modulation of the microbiota composition. However, these oligosaccharides and the products of their fermentation (SCFAs) can improve IB function through TJs modulation [186]. Many studies underline the role of inulin [187] and FOS [188] in enhancing IB through TJs assembly.

Because they have a beneficial effect on the IB and microbial composition, researchers investigated if pretreatment or supplementation with prebiotics could attenuate damage in an inflammatory environment or intestinal harm caused by food contaminants exposure. As an example, GOS pretreatment can alleviate damage of the IB in an inflammatory

environment (in LPS-challenged mice) [189]. Additionally, inulin supplementation to rats exposed to CPF, an HFD, or the association of both CPF and a HFD and in in vitro models (SHIME and Caco-2) reversed their effects on microbial composition by increasing potentially beneficial flora (*Lactobacillus* and *Bifidobacterium*), decreasing potentially pathogenic ones (*Enterococcus* and *Enterobacteriaceae*) and improving the IB integrity [26,120–122]. Thus, prebiotics use through nutrition can modulate the GM with beneficial outcomes. New methods are now emerging such as fecal transplantation, a strategy to deal with dysbiosis, that has been shown to have a positive effect on the treatment of Parkinson's disease [190].

8. Conclusions

Pesticides are generally considered to contribute to global food security, although the extent of this contribution and how it is balanced against their potential to harm human health is the subject of intense public debate. There is now evidence that the use of certain pesticides, such as Chlorpyrifos and its metabolites, has serious and long-term negative effects not only on the environment but also on human health. However, the effects of pesticides on the functional barriers that protect our body are not well known, either for the general population or for so-called vulnerable populations, such as pregnant women and their offspring. The intestinal barrier, the blood–brain barrier, and the gut microbiota play an important role in the absorption and access of food contaminants. The literature demonstrates that pesticide residues and saturated fats disrupt the intestinal microbial balance and the IB and BBB structure and function. Because the GM is the most important part ensuring the communication between the intestinal tract and the brain within the gut-microbiota-BBB axis, it is becoming one of the targets to palliate food contaminants effects and treat intestinal and brain diseases. In fact, certain prebiotics could be beneficial and counteract their effects by adjusting the microbial balance and improving the functions of biological barriers. Nevertheless, little is known about these preventive effects at the level of the gut–brain microbiota axis and still many questions are unanswered. Thus, further studies on the modulation of the GM are necessary to establish and evaluate preventing nutrition methods based on prebiotic use and other types of methods, such as fecal transplantation.

Finally, considering the DOHaD concept stating that individuals are more vulnerable to food contaminants during the perinatal period, raising awareness in the population, especially the most vulnerable categories, should be implemented by promoting a diet rich in natural fibers and lacking food contaminants.

Funding: This research received funding from the French State and the Hauts-de-France Region as part of the CPER MOSOPS project. Maria Abou Diwan received a doctoral fellowship from the 'Conseil régional du Nord-Pas-de-Calais' (50%), Picardy University (25%), and the Artois University (25%).

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

Abbreviations

ABC: ATP-Binding Cassette; ACh: Acetylcholine; AChE: Acetylcholinesterase; AJs: Adherens Junctions; ASK1: Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1; ATP: Adenosine Triphosphate; BBB: Blood–Brain Barrier; BCB: Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier; BCRP: Breast Cancer-Resistant Protein; BI: Intestinal Barrier; BM: Basement Membrane; CNS: Central Nervous System; CO₂: Carbon Dioxide; COX-2: Cyclooxygenase 2; CPF: Chlorpyrifos; CPF: Chlorpyrifos-oxon; CYP: cytochrome P450; D: Day; DEP: Diethylphosphate; DETP: Diethyl Thiophosphate; DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease; ECs: Endothelial Cells; EFSA: European Food Safety Authority; EPA: United States Environmental Protection Agency; ERK1/2: Regulated Protein Kinase; EU: European Union; FAO: Food and Agriculture Organization; FOS: Fructo-Oligosaccharides; GF: Germ-Free; GI: Digestive Tract; GIT: Gastrointestinal Tract; GLUT1: Glucose Transporter; GM: Gut Microbiota; GOS: Galacto-Oligosaccharides; GVB: Gut Vascular Barrier; H₂O: Dihydrogen Oxide; HFD: High Fat Diet; HPA: Hypothalamic–Pituitary–Adrenal; IBD: Inflammatory Bowel Disease; IBS: Irritable Bowel

Syndrome; IgA: Immunoglobulin A; IL: Interleukin; JAM (Junctional Adhesion Molecules); JNK: c-Jun NH₂-Terminal Protein Kinase; Kg: Kilogram; LDL-R: Low-Density Lipoprotein Receptor; LPS: Lipopolysaccharides; MALDI-TOF-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry; MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases; MCT: Monocarboxylate Transporters; MI: Intestinal Microbiota; MMPs: Matrix Metalloproteinases; MRP: Multidrug-Resistant Protein; NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate; NF-κB: Nuclear Factor-Kappa B; NH₃: Ammonium; NOAEL: No-Observed-Adverse-Effect Level; NOXs: Nitric Oxide; NVU: Neurovascular Unit; OPC: Organophosphorus Compound; pH: Potential of Hydrogen; REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic PCR; P-gp: Glycoprotein P; ROS: Reactive Oxygen Species; SCFAs: Short-Chain Fatty Acids; SHIME®: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem; TCP: 3,5,6- trichloro-2-pyridinol; TJs: Tight Junctions; TMA: Trimethylamine; TNF-α: Tumor Necrosis Factor; TOS: Trans-galacto-Oligosaccharides; Tregs: Regulatory T cells; TRPC4: Transient Receptor Potential Canonical Channels; WHO: World Health Organization; ZO: Zonula Occludens.

References

- Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides: An Update of Human Exposure and Toxicity. *Arch. Toxicol.* **2016**, *91*, 549–599. [CrossRef] [PubMed]
- Rathod, A.L.; Garg, R.K. Chlorpyrifos Poisoning and Its Implications in Human Fatal Cases: A Forensic Perspective with Reference to Indian Scenario. *J. Forensic Leg. Med.* **2017**, *47*, 29–34. [CrossRef] [PubMed]
- Akash, M.M.; Pawade, U.V.; Nikam, A.V. Classification of Pesticides: A Review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **2018**, *9*, 144–150. [CrossRef]
- WHO. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification*, 2019 Edition; WHO: Geneva, Switzerland, 2020. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662> (accessed on 5 March 2023).
- Carvalho, F.P. Pesticides, Environment, and Food Safety. *Food Energy Secur.* **2017**, *6*, 48–60. [CrossRef]
- Abubakar, Y.; Tijjani, H.; Egbuna, C.; Adetunji, C.O.; Kala, S.; Kryeziu, T.L.; Patrick-Iwuanyanwu, K.C. Pesticides, History, and Classification. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 29–42. [CrossRef]
- Doroudian, A.; Emadi, M.; Hosseinzadeh, R.; Maghami, P. *Biological and Molecular Effects of Pesticides on Human Health*; IntechOpen: London, UK, 2022; pp. 225–240.
- Meng, H.; Leong, W.; Leong, K.W.; Chen, C.; Zhao, Y. Walking the Line: The Fate of Nanomaterials at Biological Barriers. *Biomaterials* **2018**, *174*, 41–53. [CrossRef]
- Finbloom, J.A.; Sousa, F.; Stevens, M.M.; Desai, T.A. Engineering the Drug Carrier Biointerface to Overcome Biological Barriers to Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *167*, 89–108. [CrossRef]
- Cong, Y.; Baimanov, D.; Zhou, Y.; Chen, C.; Wang, L. Penetration and Translocation of Functional Inorganic Nanomaterials into Biological Barriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2022**, *191*, 114615. [CrossRef] [PubMed]
- Antonini, M.; Lo Conte, M.; Sorini, C.; Falcone, M. How the Interplay between the Commensal Microbiota, Gut Barrier Integrity, and Mucosal Immunity Regulates Brain Autoimmunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1937. [CrossRef]
- Vancamelbeke, M.; Vermeire, S. The Intestinal Barrier: A Fundamental Role in Health and Disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *11*, 821–834. [CrossRef]
- Saint-Pol, J.; Gosselet, F.; Duban-Deweer, S.; Pottiez, G.; Karamanos, Y. Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells* **2020**, *9*, 851. [CrossRef]
- Benz, F.; Liebner, S. Structure and Function of the Blood-Brain Barrier (BBB). *Handb. Exp. Pharmacol.* **2020**, *37*, 13–25.
- Daneman, R.; Rescigno, M. Review the Gut Immune Barrier and the Blood-Brain Barrier: Are They So Different? *Immunity* **2009**, *31*, 722–735. [CrossRef] [PubMed]
- Takiishi, T.; Ideli, C.; Fenero, M.; Olsen, N.; Câmara, S. Intestinal Barrier and Gut Microbiota: Shaping Our Immune Responses throughout Life. *Tissue Barriers* **2017**, *5*, e1373208. [CrossRef]
- Chen, Z.; Li, G. Immune Response and Blood-Brain Barrier Dysfunction during Viral Neuroinvasion. *Innate Immun.* **2020**, *27*, 109–117. [CrossRef]
- Ma, T.Y.; Nighot, P.; Al-Sadi, R. *Tight Junctions and the Intestinal Barrier*, 6th ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2018; Volume 1–2, ISBN 9780128124260.
- Versele, R.; Corsi, M.; Fuso, A.; Sevin, E.; Businaro, R.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Candela, P. Ketone Bodies Promote Amyloid-B1–40 Clearance in a Human in Vitro Blood–Brain Barrier Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 934. [CrossRef]
- Shindler, A.E.; Hill-Yardin, E.L.; Petrovski, S.; Cunningham, A.C.; Bishop, N.; Franks, A.E. Potential Determinants of Gastrointestinal Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Rev. J. Autism Dev. Disord.* **2020**, *7*, 182–196. [CrossRef]
- Anwar, H.; Irfan, S.; Hussain, G.; Naeem Faisal, M.; Muzaffar, H.; Mustafa, I.; Mukhtar, I.; Malik, S.; Irfan Ullah, M. Gut Microbiome: A New Organ System in Body. *Parasitol. Microbiol. Res.* **2020**, *1*, 17–21. [CrossRef]

22. Valdes, A.M.; Walter, J.; Segal, E.; Spector, T.D. Role of the Gut Microbiota in Nutrition and Health. *BMJ* **2018**, *361*, k2179. [[CrossRef](#)]
23. Carabotti, M.; Scirocco, A.; Maselli, M.A.; Severi, C. The Gut-Brain Axis: Interactions between Enteric Microbiota, Central and Enteric Nervous Systems. *Ann. Gastroenterol.* **2015**, *28*, 203–209.
24. Rutsch, A.; Kantsjö, J.B.; Ronchi, F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host In Fl Ammasome In Fl Uence Brain Physiology and Pathology. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 604179. [[CrossRef](#)]
25. Jin, C.; Zeng, Z.; Fu, Z.; Jin, Y. Oral Imazalil Exposure Induces Gut Microbiota Dysbiosis and Colonic Inflammation in Mice. *Chemosphere* **2016**, *160*, 349–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Djekkoun, N.; Depeint, F.; Guibourdenche, M.; El Khayat El Sabbouri, H.; Corona, A.; Rhazi, L.; Gay-Queheillard, J.; Rouabah, L.; Hamdad, F.; Bach, V.; et al. Chronic Perigestational Exposure to Chlorpyrifos Induces Perturbations in Gut Bacteria and Glucose and Lipid Markers in Female Rats and Their Offspring. *Toxics* **2022**, *10*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Toor, D.; Wasson, M.K.; Kumar, P.; Karthikeyan, G.; Kaushik, N.K.; Goel, C.; Singh, S.; Kumar, A.; Prakash, H. Dysbiosis Disrupts Gut Immune Homeostasis and Promotes Gastric Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2432. [[CrossRef](#)]
28. Martinez, J.E.; Kahana, D.D.; Ghuman, S.; Wilson, H.P.; Wilson, J.; Kim, S.C.J.; Lagishetty, V.; Jacobs, J.P.; Sinha-Hikim, A.P.; Friedman, T.C. Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 667066. [[CrossRef](#)]
29. Santhiravel, S.; Bekhit, A.E.D.A.; Mendis, E.; Jacobs, J.L.; Dunshea, F.R.; Rajapakse, N.; Ponnampalam, E.N. The Impact of Plant Phytochemicals on the Gut Microbiota of Humans for a Balanced Life. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Joly Condet, C.; Elion Dzon, B.; Hamdad, F.; Biendo, M.; Bach, V.; Khorsi-Cauet, H. Use of Molecular Typing to Investigate Bacterial Translocation from the Intestinal Tract of Chlorpyrifos-Exposed Rats. *Gut Pathog.* **2016**, *8*, 50. [[CrossRef](#)]
31. Guibourdenche, M.; El Khayat El Sabbouri, H.; Djekkoun, N.; Khorsi-Cauet, H.; Bach, V.; Anton, P.M.; Gay-Quéheillard, J. Programming of Intestinal Homeostasis in Male Rat Offspring after Maternal Exposure to Chlorpyrifos and/or to a High Fat Diet. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11420. [[CrossRef](#)]
32. Galea, I. The Blood-Brain Barrier in Systemic Infection and in Fl Ammaton. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 2489–2501. [[CrossRef](#)]
33. Djekkoun, N.; Lalau, J.D.; Bach, V.; Depeint, F.; Khorsi-Cauet, H. Chronic Oral Exposure to Pesticides and Their Consequences on Metabolic Regulation: Role of the Microbiota. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 4131–4149. [[CrossRef](#)]
34. Joly Condet, C.; Bach, V.; Mayeur, C.; Gay-Quéheillard, J.; Khorsi-Cauet, H. Chlorpyrifos Exposure during Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated with Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *61*, 30–40. [[CrossRef](#)]
35. Reygnier, J.; Condet, C.J.; Bruneau, A.; Delanaud, S.; Rhazi, L.; Depeint, F.; Abdennebi-Najar, L.; Bach, V.; Mayeur, C.; Khorsi-Cauet, H. Changes in Composition and Function of Human Intestinal Microbiota Exposed to Chlorpyrifos in Oil as Assessed by the SHIME® Model. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Safi-Stibler, S.; Gabory, A. Seminars in Cell & Developmental Biology Epigenetics and the Developmental Origins of Health and Disease: Parental Environment Signalling to the Epigenome, Critical Time Windows and Sculpting the Adult Phenotype. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *97*, 172–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Korpela, K.; de Vos, W.M. Early Life Colonization of the Human Gut: Microbes Matter Everywhere. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *44*, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Backhed, F.; Roswall, J.; Peng, Y.; Feng, Q.; Jia, H.; Kovatcheva-datchary, P. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life Resource Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 690–703. [[CrossRef](#)]
39. Jiménez, E.; Fernández, L.; Marín, M.L.; Martín, R.; Odriozola, J.M.; Nueno-Palop, C.; Narbad, A.; Olivares, M.; Xaus, J.; Rodríguez, J.M. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 270–274. [[CrossRef](#)]
40. Jiménez, E.; Marín, M.L.; Martín, R.; Odriozola, J.M.; Olivares, M.; Xaus, J.; Fernández, L.; Rodríguez, J.M. Is Meconium from Healthy Newborns Actually Sterile? *Res. Microbiol.* **2008**, *159*, 187–193. [[CrossRef](#)]
41. Moles, L.; Gómez, M.; Heilig, H.; Bustos, G.; Fuentes, S.; de Vos, W.; Fernández, L.; Rodríguez, J.M.; Jiménez, E. Bacterial Diversity in Meconium of Preterm Neonates and Evolution of Their Fecal Microbiota during the First Month of Life. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66986. [[CrossRef](#)]
42. Nishino, R.; Mikami, K.; Takahashi, H.; Tomonaga, S.; Furuse, M.; Hiramoto, T.; Aiba, Y.; Koga, Y.; Sudo, N. Commensal Microbiota Modulate Murine Behaviors in a Strictly Contamination-Free Environment Confirmed by Culture-Based Methods. *Neurogastroenterol. Motil.* **2013**, *25*, 521–e371. [[CrossRef](#)]
43. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1823–1836. [[CrossRef](#)]
44. Harris, M.A.; Reddy, C.A.; Carter, G.R. Anaerobic Bacteria from the Large Intestine of Mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, *31*, 907–912. [[CrossRef](#)]
45. Jovel, J.; Dieleman, L.A.; Kao, D.; Mason, A.L.; Wine, E. The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Metagenomics Perspect. Methods Appl.* **2018**, *13*, 197–213. [[CrossRef](#)]
46. Dinan, T.G.; Cryan, J.F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2017**, *46*, 77–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Magne, F.; Gotteland, M.; Gauthier, L.; Zazueta, A.; Pesoa, S.; Navarrete, P.; Balamurugan, R. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* **2020**, *12*, 1474. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Sekirov, I.; Russell, S.L.; Antunes, L.C.M.; Finlay, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 859–904. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Lozupone, C.A.; Stombaugh, J.I.; Gordon, J.I.; Jansson, J.K.; Knight, R. Diversity, Stability and Resilience of the Human Gut Microbiota. *Nature* **2012**, *489*, 220–230. [\[CrossRef\]](#)
50. Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **2019**, *7*, 14. [\[CrossRef\]](#)
51. Vaga, S.; Lee, S.; Ji, B.; Andreasson, A.; Talley, N.J.; Agréus, L.; Bidkhor, G.; Kovatcheva-Datchary, P.; Park, J.; Lee, D.; et al. Compositional and Functional Differences of the Mucosal Microbiota along the Intestine of Healthy Individuals. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14977. [\[CrossRef\]](#)
52. D'Amelio, P.D. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif. Tissue Int.* **2017**, *102*, 415–425. [\[CrossRef\]](#)
53. Logsdon, A.F.; Erickson, M.A.; Rhea, E.M.; Salameh, T.S.; Banks, W.A. Gut Reactions: How the Blood-Brain Barrier Connects the Microbiome and the Brain. *Exp. Biol. Med.* **2018**, *243*, 159–165. [\[CrossRef\]](#)
54. Akhtar, M.; Chen, Y.; Ma, Z.; Zhang, X.; Shi, D.; Khan, J.A.; Liu, H. Gut Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids Are Potential Mediators in Gut Inflammation. *Anim. Nutr. (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)* **2021**, *8*, 350–360. [\[CrossRef\]](#)
55. Smith, P.M.; Howitt, M.R.; Panikov, N.; Michaud, M.; Gallini, C.A.; Bohlooly-y, M.; Glickman, J.N.; Garrett, W.S. The Microbial Metabolites, SCFAs, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* **2013**, *341*, 569–573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Braniste, V.; Al-Asmakh, M.; Kowal, C.; Anuar, F.; Abbaspour, A.; Tóth, M.; Korecka, A.; Bakocevic, N.; Ng, L.G.; Kundu, P.; et al. The Gut Microbiota Influences Blood-Brain Barrier Permeability in Mice. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 263ra158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Tang, W.H.W.; Kitai, T.; Hazen, S.L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1183–1196. [\[CrossRef\]](#)
58. Shah, S.N.; Knausenberger, T.B.; Connell, E.; Le Gall, G.; Hardy, T.A.; Randall, D.W.; McCafferty, K.; Yaqoob, M.M.; Solito, E.; Müller, M.; et al. Cerebrovascular Damage Caused by the Gut Microbe-Derived Uraemic Toxin p-Cresol Sulfate Is Prevented by Blockade of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Brain Behav. Immun.* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
59. Brittany, D.; Needham, M.F.; Adame, M.D.; Wang, Z.; Boktor, J.C.; Haney, J.; Wu, W.-L.; Rabut, C.; Ladinsky, M.S.; Hwang, S.-J.; et al. A Gut-Derived Metabolite Alters Brain Activity and Anxiety Behaviour in Mice. *Nature* **2022**, *602*, 647–653. [\[CrossRef\]](#)
60. Groschwitz, K.R.; Hogan, S.P. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *124*, 3–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Zhou, J.; Yue, J.; Yao, Y.; Hou, P.; Zhang, T.; Zhang, Q.; Yi, L.; Mi, M. Dihydromyricetin Protects Intestinal Barrier Integrity by Promoting IL-22 Expression in ILC3s through the AMPK/SIRT3/STAT3 Signaling Pathway. *Nutrients* **2023**, *15*, 355. [\[CrossRef\]](#)
62. Condette, C.J.; Khorsi-Cauet, H.; Morlière, P.; Zabijak, L.; Reygnier, J.; Bach, V.; Gay-Quéheillard, J. Increased Gut Permeability and Bacterial Translocation after Chronic Chlorpyrifos Exposure in Rats. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102217. [\[CrossRef\]](#)
63. Rohr, M.W.; Narasimhulu, C.A.; Rudeski-Rohr, T.A.; Parthasarathy, S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv. Nutr.* **2020**, *11*, 77–91. [\[CrossRef\]](#)
64. Herath, M.; Hosie, S.; Bornstein, J.C.; Franks, A.E.; Hill-Yardin, E.L. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 248. [\[CrossRef\]](#)
65. Allaire, J.M.; Crowley, S.M.; Law, H.T.; Chang, S.Y.; Ko, H.J.; Vallance, B.A. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 677–696. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Martin, A.M.; Young, R.L.; Leong, L.; Rogers, G.B.; Spencer, N.J.; Jessup, C.F.; Keating, D.J. Cellular Regulation of Peripheral Serotonin. In *Serotonin*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 137–153. [\[CrossRef\]](#)
67. Putignani, L.; Del Chierico, F.; Vernocchi, P.; Cicala, M.; Cucchiara, S.; Dallapiccola, B. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22*, 487–504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Lee, B.; Moon, K.M.; Kim, C.Y. Review Article Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 2645465. [\[CrossRef\]](#)
69. Holmes, J.L.; Van Itallie, C.M.; Rasmussen, J.E.; Anderson, J.M. Claudin Profiling in the Mouse during Postnatal Intestinal Development and along the Gastrointestinal Tract Reveals Complex Expression Patterns. *Gene Expr. Patterns* **2006**, *6*, 581–588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Scalise, A.A.; Kakogiannos, N.; Zanardi, F.; Iannelli, F.; Giannotta, M. The Blood–Brain and Gut–Vascular Barriers: From the Perspective of Claudins. *Tissue Barriers* **2021**, *9*, 1926190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Greene, C.; Hanley, N.; Campbell, M. Claudin-5: Gatekeeper of Neurological Function. *Fluids Barriers CNS* **2019**, *16*, 3. [\[CrossRef\]](#)
72. Otani, T. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol.* **2020**, *30*, 805–817. [\[CrossRef\]](#)
73. Kuo, W.T.; Zuo, L.; Odenwald, M.A.; Madha, S.; Singh, G.; Gurniak, C.B.; Abraham, C.; Turner, J.R. The Tight Junction Protein ZO-1 Is Dispensable for Barrier Function but Critical for Effective Mucosal Repair. *Gastroenterology* **2021**, *161*, 1924–1939. [\[CrossRef\]](#)
74. Bieczynski, F.; Painealú, J.C.; Venturino, A.; Luquet, C.M.; Lionetto, M.G. Expression and Function of ABC Proteins in Fish Intestine. *Front. Physiol.* **2021**, *12*, 2230. [\[CrossRef\]](#)

75. Cecchelli, R.; Berezowski, V.; Lundquist, S.; Culot, M.; Renftel, M.; Dehouck, M.P.; Fenart, L. Modelling of the Blood-Brain Barrier in Drug Discovery and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 650–661. [\[CrossRef\]](#)
76. Gosselet, F.; Candela, P.; Cecchelli, R.; Fenart, L. La Barrière Hématoencéphalique Une Nouvelle Cible Thérapeutique Dans La Maladie d'Alzheimer? *Med./Sci.* **2011**, *27*, 987–992. [\[CrossRef\]](#)
77. Mou, Y.; Du, Y.; Zhou, L.; Yue, J.; Hu, X.; Liu, Y.; Chen, S.; Lin, X.; Zhang, G.; Xiao, H.; et al. Gut Microbiota Interact with the Brain through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1046. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. De Aquino, C.C.; Leitão, R.A.; Alves, L.A.O.; Coelho-Santos, V.; Guerrant, R.L.; Ribeiro, C.F.; Malva, J.O.; Silva, A.P.; Oriá, R.B. Effect of Hypoproteic and High-Fat Diets on Hippocampal Blood-Brain Barrier Permeability and Oxidative Stress. *Front. Nutr.* **2019**, *5*, 131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Oldendorf, W.H.; Cornford, M.E.; Brown, W.J. The Large Apparent Work of the Blood-Brain Barrier: The Mitochondria1 Content of Capillary Endothelial Cells in Brain and Other Tissues of the Rat. *Ann. Neurol. Off. J. Am. Neurol. Assoc. Child Neurol. Soc.* **1977**, *1*, 409–417. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Stewart, P.A. Endothelial Vesicles in the Blood-Brain Barrier: Are They Related to Permeability? *Cell. Mol. Neurobiol.* **2000**, *20*, 149–163. [\[CrossRef\]](#)
81. Gosselet, F.; Saint-Pol, J.; Fenart, L. Effects of Oxysterols on the Blood-Brain Barrier: Implications for Alzheimer's Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 687–691. [\[CrossRef\]](#)
82. Al-asmakh, M.; Hedin, L.; Al-asmakh, M.; Hedin, L. Microbiota and the Control of Blood-Tissue Barriers Microbiota and the Control of Blood-Tissue Barriers. *Tissue Barriers* **2015**, *3*, e1039691. [\[CrossRef\]](#)
83. Haseloff, R.F.; Dithmer, S.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Blasig, I.E. Transmembrane Proteins of the Tight Junctions at the Blood-Brain Barrier: Structural and Functional Aspects. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *38*, 16–25. [\[CrossRef\]](#)
84. Versele, R.; Sevin, E.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Candela, P. TNF- α and IL-1 β Modulate Blood-Brain Barrier Permeability and Decrease Amyloid- β Peptide Efflux in a Human Blood-Brain Barrier Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10235. [\[CrossRef\]](#)
85. Gosselet, F.; Azevedo, R.; Roig, A.; Rosell, A.; Culot, M. Neurochemistry International Central Nervous System Delivery of Molecules across the Blood-Brain Barrier. *Neurochem. Int.* **2021**, *144*, 104952. [\[CrossRef\]](#)
86. Dib, S.; Pahnke, J.; Gosselet, F. Role of ABCA7 in Human Health and in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci. Rev.* **2021**, *7*, 4603. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Parran, D.K.; Magnin, G.; Li, W.; Jortner, B.S.; Ehrich, M. Chlorpyrifos Alters Functional Integrity and Structure of an in Vitro BBB Model: Co-Cultures of Bovine Endothelial Cells and Neonatal Rat Astrocytes. *Neurotoxicology* **2005**, *26*, 77–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Li, W.; Ehrich, M. Transient Alterations of the Blood-Brain Barrier Tight Junction and Receptor Potential Channel Gene Expression by Chlorpyrifos. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 1187–1191. [\[CrossRef\]](#)
89. Chedik, L.; Bruyere, A.; Bacle, A.; Potin, S.; Le Vée, M.; Fardel, O. Interactions of Pesticides with Membrane Drug Transporters: Implications for Toxicokinetics and Toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2018**, *14*, 739–752. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Balaguer-Trias, J.; Deepika, D.; Schuhmacher, M.; Kumar, V. Impact of Contaminants on Microbiota: Linking the Gut-Brain Axis with Neurotoxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 1368. [\[CrossRef\]](#)
91. Collins, S.M.; Surette, M.; Bercik, P. The Interplay between the Intestinal Microbiota and the Brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 735–742. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Appleton, J. The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. *Integr. Med.* **2018**, *17*, 28.
93. Spadoni, I.; Zagato, E.; Bertocchi, A.; Paolinelli, R.; Hot, E.; Di Sabatino, A.; Caprioli, F.; Bottiglieri, L.; Oldani, A.; Viale, G.; et al. A Gut-Vascular Barrier Controls the Systemic Dissemination of Bacteria. *Science* **2015**, *350*, 830–834. [\[CrossRef\]](#)
94. Spadoni, I.; Pietrelli, A.; Pesole, G.; Rescigno, M. Gene Expression Profile of Endothelial Cells during Perturbation of the Gut Vascular Barrier. *Gut Microbes* **2016**, *7*, 540–548. [\[CrossRef\]](#)
95. Yano, J.M.; Yu, K.; Donaldson, G.P.; Shastri, G.G.; Ann, P.; Ma, L.; Nagler, C.R.; Ismagilov, R.F.; Mazmanian, S.K.; Hsiao, E.Y. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* **2015**, *161*, 264–276. [\[CrossRef\]](#)
96. Parker, A.; Fonseca, S.; Carding, S.R. Gut Microbes and Metabolites as Modulators of Blood-Brain Barrier Integrity and Brain Health. *Gut Microbes* **2020**, *11*, 135–157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Long, D.; Liu, M.; Li, H.; Song, J.; Jiang, X.; Wang, G.; Yang, X. Dysbacteriosis Induces Abnormal Neurogenesis via LPS in a Pathway Requiring NF-KB/IL-6. *Pharmacol. Res.* **2021**, *167*, 105543. [\[CrossRef\]](#)
98. Frost, G.; Sleeth, M.L.; Sahuri-Arisoylu, M.; Lizarbe, B.; Cerdan, S.; Brody, L.; Anastasovska, J.; Ghourab, S.; Hankir, M.; Zhang, S.; et al. The Short-Chain Fatty Acid Acetate Reduces Appetite via a Central Homeostatic Mechanism. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3611. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Erny, D.; Dokalis, N.; Mezö, C.; Castoldi, A.; Mossad, O.; Staszewski, O.; Frosch, M.; Villa, M.; Fuchs, V.; Mayer, A.; et al. Microbiota-Derived Acetate Enables the Metabolic Fitness of the Brain Innate Immune System during Health and Disease. *Cell Metab.* **2021**, *33*, 2260–2276.e7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Duscha, A.; Gisevius, B.; Hirschberg, S.; Linker, R.A.; Gold, R.; Haghighi, A.; Duscha, A.; Gisevius, B.; Hirschberg, S.; Yissachar, N.; et al. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Article Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* **2020**, *180*, 1067–1080. [\[CrossRef\]](#)
101. Sarkar, S.R.; Banerjee, S. *Gut Microbiota in Neurodegenerative Disorders*; Elsevier B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 2019.

102. Yang, X.; Yu, D.; Xue, L.; Li, H.; Du, J. Probiotics Modulate the Microbiota–Gut–Brain Axis and Improve Memory Deficits in Aged SAMP8 Mice. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 475–487. [\[CrossRef\]](#)
103. Netea, M.G.; Balkwill, F.; Chonchol, M.; Cominelli, F.; Donath, M.Y.; Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Golenbock, D.; Gresnigt, M.S.; Heneka, M.T.; Hoffman, H.M.; et al. A Guiding Map for Inflammation. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 826–831. [\[CrossRef\]](#)
104. Furman, D.; Campisi, J.; Verdin, E.; Carrera-Bastos, P.; Targ, S.; Franceschi, C.; Ferrucci, L.; Gilroy, D.W.; Fasano, A.; Miller, G.W.; et al. Chronic Inflammation in the Etiology of Disease across the Life Span. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1822–1832. [\[CrossRef\]](#)
105. Santocchi, E.; Guiducci, L.; Fulceri, F.; Billeci, L.; Buzzigoli, E.; Apicella, F.; Calderoni, S.; Grossi, E.; Morales, M.A.; Muratori, F. Gut to Brain Interaction in Autism Spectrum Disorders: A Randomized Controlled Trial on the Role of Probiotics on Clinical, Biochemical and Neurophysiological Parameters. *BMC Psychiatry* **2016**, *16*, 183. [\[CrossRef\]](#)
106. Zhao, K.; Song, X.; Huang, Y.; Yao, J.; Zhou, M.; Li, Z.; You, Q.; Guo, Q.; Lu, N. Wogonin Inhibits LPS-Induced Tumor Angiogenesis via Suppressing PI3K/Akt/NF-KB Signaling. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *737*, 57–69. [\[CrossRef\]](#)
107. Sui, Y.T.; Bullock, K.M.; Erickson, M.A.; Zhang, J.; Banks, W.A. Alpha Synuclein Is Transported into and out of the Brain by the Blood–Brain Barrier. *Peptides* **2014**, *62*, 197–202. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Clairembault, T.; Leclair-Visonneau, L.; Coron, E.; Bourreille, A.; Le Dily, S.; Vavasseur, F.; Heymann, M.F.; Neunlist, M.; Derkinderen, P. Structural Alterations of the Intestinal Epithelial Barrier in Parkinson’s Disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2015**, *3*, 12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
109. Zhao, Y.; Zhang, Y.; Wang, G.; Han, R.; Xie, X. Effects of Chlorpyrifos on the Gut Microbiome and Urine Metabolome in Mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere* **2016**, *153*, 287–293. [\[CrossRef\]](#)
110. Tang, Q.; Tang, J.; Ren, X.; Li, C. Glyphosate Exposure Induces Inflammatory Responses in the Small Intestine and Alters Gut Microbial Composition in Rats. *Environ. Pollut.* **2020**, *261*, 114129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
111. FAO; WHO. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides Guidelines on Developing a Reporting System for Health and Environmental Incidents Resulting from Exposure to Pesticide*; FAO: Rome, Italy; WHO: Geneva, Switzerland, 2009; ISBN 9789251068311.
112. Kaur, R.; Mavi, G.K.; Raghav, S.; Khan, I. Pesticides Classification and Its Impact on Environment. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *8*, 1889–1897. [\[CrossRef\]](#)
113. Aroonvilairat, S.; Tangjarukij, C.; Sornprachum, T.; Chaisuriya, P.; Siwadune, T.; Ratanabanangkoon, K. Effects of Topical Exposure to a Mixture of Chlorpyrifos, Cypermethrin and Captan on the Hematological and Immunological Systems in Male Wistar Rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2018**, *59*, 53–60. [\[CrossRef\]](#)
114. Lukowicz, C.; Ellero-simatos, S.; Régnier, M.; Polizzi, A.; Lasserre, F.; Montagner, A.; Lippi, Y.; Jamin, E.L.; Martin, J.; Naylies, C.; et al. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice: Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ. Health Perspect.* **2018**, *126*, 067007. [\[CrossRef\]](#)
115. Smith, L.; Klément, W.; Dopavogui, L.; De Bock, F.; Lasserre, F.; Barretto, S.; Lukowicz, C.; Fougerat, A.; Polizzi, A.; Schaal, B.; et al. Perinatal Exposure to a Dietary Pesticide Cocktail Does Not Increase Susceptibility to High-Fat Diet-Induced Metabolic Perturbations at Adulthood but Modi Fi Es Urinary and Fecal Metabolic Fi Ngerprints in C57Bl6/J Mice. *Environ. Int.* **2020**, *144*, 106010. [\[CrossRef\]](#)
116. Kaur, R. Metabolism of Pesticides by Human Cytochrome P450 (CYPs). *Int. J. Creat. Res. Thoughts* **2018**, *6*, 1293–1300. [\[CrossRef\]](#)
117. Parathion|ToxFAQsTM|ATSDR. Available online: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxFAQs/ToxFAQsDetails.aspx?faqid=1426&toxid=246> (accessed on 15 March 2023).
118. Carrasco Cabrera, L.; Medina Pastor, P. The 2019 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06491. [\[CrossRef\]](#)
119. Tirelli, V.; Catone, T.; Turco, L.; Di Consiglio, E.; Testai, E.; De Angelis, I. Effects of the Pesticide Clorpyrifos on an in Vitro Model of Intestinal Barrier. *Toxicol. Vitro.* **2007**, *21*, 308–313. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
120. Reygnier, J.; Lichtenberger, L.; Elmhiri, G.; Dou, S.; Bahi-Jaber, N.; Rhazi, L.; Depeint, F.; Bach, V.; Khorsi-Cauet, H.; Abdennebi-Najar, L. Inulin Supplementation Lowered the Metabolic Defects of Prolonged Exposure to Chlorpyrifos from Gestation to Young Adult Stage in Offspring Rats. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
121. Réquillé, M.; González Alvarez, D.O.; Delanaud, S.; Rhazi, L.; Bach, V.; Depeint, F.; Khorsi-Cauet, H. Use of a Combination of in Vitro Models to Investigate the Impact of Chlorpyrifos and Inulin on the Intestinal Microbiota and the Permeability of the Intestinal Mucosa. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 22529–22540. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
122. Djekkoun, N.; Depeint, F.; Guibourdenche, M.; El, H.; Et, K.; Aurélie, S.; Rhazi, L.; Gay, J.; Leila, Q.; Maurice, R.; et al. Perigestational Exposure of a Combination of a High-Fat Diet and Pesticide Impacts the Metabolic and Microbiotic Status of Dams and Pups; a Preventive Strategy Based on Prebiotics. *Eur. J. Nutr.* **2022**, *62*, 1253–1265. [\[CrossRef\]](#)
123. Betancourt, A.M.; Carr, R.L. The Effect of Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-Oxon on Brain Cholinesterase, Muscarinic Receptor Binding, and Neurotrophin Levels in Rats Following Early Postnatal Exposure. *Toxicol. Sci.* **2004**, *71*, 63–71. [\[CrossRef\]](#)
124. El, H.; El, K.; Darwiche, W. Impact of Chronic Exposure to the Pesticide Chlorpyrifos on Respiratory Parameters and Sleep Apnea in Juvenile and Adult Rats. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191237.
125. Gao, A.B.; Chi, L.; Tu, P.; Bian, X.; Thomas, J.; Ru, H.; Lu, K. The Organophosphate Malathion Disturbs Gut Microbiome Development and the Quorum-Sensing System. *Toxicol. Lett.* **2017**, *283*, 52–57. [\[CrossRef\]](#)
126. Gao, B.; Bian, X.; Chi, L.; Tu, P.; Ru, H.; Lu, K. Organophosphate Diazinon Altered Quorum Sensing, Cell Motility, Stress Response, and Carbohydrate Metabolism of Gut Microbiome. *Toxicol. Sci.* **2017**, *157*, 354–364. [\[CrossRef\]](#)

127. Meng, Z.; Liu, L.; Yan, S.; Sun, W.; Jia, M.; Tian, S.; Huang, S.; Zhou, Z.; Zhu, W. Gut Microbiota: A Key Factor in the Host Health Effects Induced by Pesticide Exposure. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 10517–10531. [CrossRef]
128. Timofeeva, O.A.; Roegge, C.S.; Seidler, F.J.; Slotkin, T.A.; Levin, E.D. Persistent Cognitive Alterations in Rats after Early Postnatal Exposure to Low Doses of the Organophosphate Pesticide, Diazinon. *Neurotoxicol. Teratol.* **2008**, *30*, 38–45. [CrossRef]
129. Balbuena, P.; Li, W.; Magnin-bissel, G.; Meldrum, J.B.; Ehrich, M. Comparison of Two Blood-Brain Barrier In Vitro Systems: Cytotoxicity and Transfer Assessments of Malathion/Oxon and Lead Acetate. *Toxicol. Sci.* **2010**, *114*, 260–271. [CrossRef] [PubMed]
130. Venkatesan, R.; Park, Y.U.; Ji, E.; Yeo, E.; Kim, S.Y. Malathion Increases Apoptotic Cell Death by Inducing Lysosomal Membrane Permeabilization in N2a Neuroblastoma Cells: A Model for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Cell Death Discov.* **2017**, *11*, 17007. [CrossRef] [PubMed]
131. Martinez, A.; Al-ahmad, A.J. Effects of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid on an Isogenic Model of the Human Blood-Brain Barrier. *Toxicol. Lett.* **2018**, *304*, 39–49. [CrossRef]
132. Heusinkveld, H.J.; Molendijk, J.; Van Den Berg, M.; Westerink, R.H.S. Azole Fungicides Disturb Intracellular Ca²⁺ in an Additive Manner in Dopaminergic PC12 Cells. *Toxicol. Sci.* **2013**, *134*, 374–381. [CrossRef]
133. Heusinkveld, H.J.; Westerink, R.H.S. Comparison of Different In Vitro Cell Models for the Assessment of Pesticide-Induced Dopaminergic Neurotoxicity Authors. *Toxicol. Vitro.* **2017**, *45*, 81–88. [CrossRef]
134. Jin, C.; Xia, J.; Wu, S.; Tu, W.; Pan, Z.; Fu, Z.; Wang, Y.; Jin, Y. Insights into a Possible Influence on Gut Microbiota and Intestinal Barrier Function During Chronic Exposure of Mice to Imazalil. *Toxicol. Sci.* **2018**, *162*, 113–123. [CrossRef] [PubMed]
135. Martins-gomes, C.; Coutinho, T.E.; Silva, T.L.; Andreani, T.; Silva, M. In Vitro Enzymatic Inhibition Assays. *Toxics* **2022**, *10*, 448. [CrossRef] [PubMed]
136. Supreeth, M.; Raju, N. Biotransformation of Chlorpyrifos and Endosulfan by Bacteria and Fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 5961–5971. [CrossRef]
137. EPA. Frequent Questions about the Chlorpyrifos 2021 Final Rule|US EPA. Available online: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/frequent-questions-about-chlorpyrifos-2021-final-rule> (accessed on 5 March 2023).
138. Iowa State University. Updates on Chlorpyrifos Uses in 2022|Integrated Crop Management. Available online: <https://crops.extension.iastate.edu/cropnews/2022/03/updates-chlorpyrifos-uses-2022> (accessed on 5 March 2023).
139. Zhang, Q.; Zheng, S.; Wang, S.; Wang, W.; Xing, H.; Xu, S. Chlorpyrifos Induced Oxidative Stress to Promote Apoptosis and Autophagy through the Regulation of MiR-19a-AMPK Axis in Common Carp. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, *93*, 1093–1099. [CrossRef]
140. Brahmand, M.B.; Yunesian, M.; Nabizadeh, R.; Nasser, S.; Alimohammadi, M. Evaluation of Chlorpyrifos Residue in Breast Milk and Its Metabolite in Urine of Mothers and Their Infants Feeding Exclusively by Breast Milk in North of Iran. *J. Environ. Heal. Sci. Eng.* **2019**, *17*, 817–825. [CrossRef]
141. Prasad, J.; Abraham, V.J.; Minz, S.; Abraham, S.; Joseph, A.; Muliyl, J.P.; George, K.; Jacob, K.S. Rates and Factors Associated with Suicide in Kaniyambadi Block, Tamil Nadu, South India, 2000–2002. *Int. J. Soc. Psychiatry* **2006**, *52*, 65–71. [CrossRef] [PubMed]
142. Nolan, R.J.; Rick, D.L.; Freshour, N.L.; Saunders, J.H. Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, *15*, 8–15. [CrossRef] [PubMed]
143. Sancho, J.V.; Pozo, O.J. Direct Determination of Chlorpyrifos and Its Main Serum and Urine by Coupled-Column Liquid Chromatography/Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *1490*, 1485–1490. [CrossRef]
144. Yang, F.; Li, J.; Pang, G.; Ren, F.; Fang, B. Effects of Diethyl Phosphate, a Non-Specific Metabolite of Organophosphorus Pesticides, on Serum Lipid, Hormones, Inflammation, and Gut Microbiota. *Molecules* **2019**, *24*, 2003. [CrossRef]
145. NPIC. Chlorpyrifos Technical Fact Sheet by the National Pesticide Information Center. Available online: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html> (accessed on 5 March 2023).
146. Harishankar, M.K.; Sasikala, C.; Ramya, M. Efficiency of the Intestinal Bacteria in the Degradation of the Toxic Pesticide, Chlorpyrifos. *3 Biotech* **2013**, *3*, 137–142. [CrossRef]
147. Wang, Z.; Wang, W.; Lu, Y. Biodegradation of Insecticides by Gut Bacteria Isolated from Stored Grain Beetles and Its Implication in Host Insecticide Resistance. *J. Stored Prod. Res.* **2022**, *96*, 101943. [CrossRef]
148. Ibrahim, S.; Gupta, R.K.; War, A.R.; Hussain, B.; Kumar, A.; Sofi, T.; Noureldeen, A.; Darwish, H. Degradation of Chlorpyrifos and Polyethylene by Endosymbiotic Bacteria from Citrus Mealybug. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 3214–3224. [CrossRef]
149. Liu, J.; Tan, L.; Wang, J.; Wang, Z.; Ni, H.; Li, L. Complete Biodegradation of Chlorpyrifos by Engineered *Pseudomonas Putida* Cells Expressing Surface-Immobilized Laccases. *Chemosphere* **2016**, *157*, 200–207. [CrossRef]
150. Gilani, R.A.; Rafique, M.; Rehman, A.; Munis, M.F.H.; Rehman, S.U.; Chaudhary, H.J. Biodegradation of Chlorpyrifos by Bacterial Genus *Pseudomonas*. *J. Basic Microbiol.* **2016**, *56*, 105–119. [CrossRef]
151. Vidya Lakshmi, C.; Kumar, M.; Khanna, S. Biotransformation of Chlorpyrifos and Bioremediation of Contaminated Soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, *62*, 204–209. [CrossRef]
152. Li, X.; Jiang, J.; Gu, L.; Ali, S.W.; He, J.; Li, S. Diversity of Chlorpyrifos-Degrading Bacteria Isolated from Chlorpyrifos-Contaminated Samples. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, *62*, 331–335. [CrossRef]
153. Vidya Lakshmi, C.; Kumar, M.; Khanna, S. Biodegradation of Chlorpyrifos in Soil by Enriched Cultures. *Curr. Microbiol.* **2009**, *58*, 35–38. [CrossRef] [PubMed]

154. Ishag, A.E.S.A.; Abdelbagi, A.O.; Hammad, A.M.A.; Elsheikh, E.A.E.; Elsaid, O.E.; Hur, J.H.; Laing, M.D. Biodegradation of Chlorpyrifos, Malathion, and Dimethoate by Three Strains of Bacteria Isolated from Pesticide-Polluted Soils in Sudan. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 8491–8498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
155. Sasikala, C.; Jiwal, S.; Rout, P.; Ramya, M. Biodegradation of Chlorpyrifos by Bacterial Consortium Isolated from Agriculture Soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *28*, 1301–1308. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
156. Li, J.; Liu, J.; Shen, W.; Zhao, X.; Hou, Y.; Cao, H.; Cui, Z. Isolation and Characterization of 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol-Degrading *Ralstonia* sp. Strain T6. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 7479–7483. [\[CrossRef\]](#)
157. Ostrea, E.M.; Morales, V.; Ngoumna, E.; Prescilla, R.; Tan, E.; Hernandez, E.; Ramirez, G.B.; Cifra, H.L.; Manlapaz, M.L. Prevalence of Fetal Exposure to Environmental Toxins as Determined by Meconium Analysis. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, 329–339. [\[CrossRef\]](#)
158. Berton, T.; Mayhoub, F.; Chardon, K.; Duca, R.C.; Lestremay, F.; Bach, V.; Tack, K. Development of an Analytical Strategy Based on LC-MS/MS for the Measurement of Different Classes of Pesticides and Theirs Metabolites in Meconium: Application and Characterisation of Foetal Exposure in France. *Environ. Res.* **2014**, *132*, 311–320. [\[CrossRef\]](#)
159. El-Baz, M.A.; El-Deek, S.E.; Nsar, A.Y.; El-Maali, N.A.; AbdelHafez, F.F.; Amin, A.F. Prenatal Pesticide Exposure: Meconium as a Biomarker and Impact on Fetal Weight. *J. Environ. Anal. Toxicol.* **2015**, *5*, 1000268. [\[CrossRef\]](#)
160. Onchoi, C.; Kongtip, P.; Nankongnab, N.; Chantanakul, S.; Sujirarat, D.; Woskie, S. Organophosphates in Meconium of Newborn Babies Whose Mothers Resided in Agricultural Areas of Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2020**, *51*, 77–87.
161. Bruckner, J.V. Differences in Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity: The NAS Panel Report. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2000**, *31*, 280–285. [\[CrossRef\]](#)
162. Richardson, J.R.; Fitsanakis, V.; Westerink, R.H.S.; Kanthasamy, A.G. Neurotoxicity of Pesticides. *Acta Neuropathol.* **2019**, *138*, 343–362. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
163. Li, J.W.; Fang, B.; Pang, G.F.; Zhang, M.; Ren, F.Z. Age- and Diet-Specific Effects of Chronic Exposure to Chlorpyrifos on Hormones, Inflammation and Gut Microbiota in Rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *159*, 68–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
164. Abbott, N.J.; Patabendige, A.A.K.; Dolman, D.E.M.; Yusof, S.R.; Begley, D.J. Structure and Function of the Blood-Brain Barrier. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13–25. [\[CrossRef\]](#)
165. Profaci, C.P.; Munji, R.N.; Pulido, R.S.; Daneman, R. The Blood–Brain Barrier in Health and Disease: Important Unanswered Questions. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20190062. [\[CrossRef\]](#)
166. Chang, A.Y. Pro-Life Role for c-Jun N-Terminal Kinase and P38 Mitogen-Activated Protein Kinase at Rostral Ventrolateral Medulla in Experimental Brain Stem Death. *J. Biomed. Sci.* **2012**, *19*, 96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
167. Farkhondeh, T.; Mehrpour, O.; Buhmann, C.; Pourbagher-Shahri, A.M.; Shakibaei, M.; Samarghandian, S. Organophosphorus Compounds and MAPK Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4258. [\[CrossRef\]](#)
168. Yue, J.; López, J.M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2346. [\[CrossRef\]](#)
169. Ki, Y.W.; Park, J.H.; Lee, J.E.; Shin, I.C.; Koh, H.C. JNK and P38 MAPK Regulate Oxidative Stress and the Inflammatory Response in Chlorpyrifos-Induced Apoptosis. *Toxicol. Lett.* **2013**, *218*, 235–245. [\[CrossRef\]](#)
170. Vandooren, J.; Van Den Steen, P.E.; Opdenakker, G. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9): The next Decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *48*, 222–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
171. Al-Sadi, R.; Youssef, M.; Rawat, M.; Guo, S.; Dokladny, K.; Haque, M.; Watterson, M.D.; Ma, T.Y. MMP-9-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is Mediated by P38 Kinase Signaling Pathway Activation of MLCK Gene. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **2019**, *316*, G278–G290. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
172. Bauer, A.T.; Bürgers, H.F.; Rabie, T.; Marti, H.H. Matrix Metalloproteinase-9 Mediates Hypoxia-Induced Vascular Leakage in the Brain via Tight Junction Rearrangement. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 837–848. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
173. Turner, R.J.; Sharp, F.R. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* **2016**, *10*, 56. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
174. Chen, J.; Shao, B.; Wang, J.; Shen, Z.; Liu, H.; Li, S. Chlorpyrifos Caused Necroptosis via MAPK/NF-KB/TNF- α Pathway in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Gills. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2021**, *249*, 109126. [\[CrossRef\]](#)
175. Sule, R.O.; Condon, L.; Gomes, A.V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2022**, *2022*, 5563759. [\[CrossRef\]](#)
176. Ribeiro, G.; Ferri, A.; Clarke, G.; Cryan, J.F. Diet and the Microbiota–Gut–Brain-Axis: A Primer for Clinical Nutrition. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2022**, *25*, 443–450. [\[CrossRef\]](#)
177. Idrees, M.; Imran, M.; Atiq, N.; Zahra, R.; Abid, R.; Alreshidi, M.; Roberts, T.; Abdelgadir, A.; Tipu, M.K.; Farid, A.; et al. Probiotics, Their Action Modality and the Use of Multi-Omics in Metamorphosis of Commensal Microbiota into Target-Based Probiotics. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 1–21. [\[CrossRef\]](#)
178. Akimowicz, M.; Srednicka, P.; Juszczuk-kubiak, E.; Micha, W.; Roszko, M. Probiotics as a Biological Detoxification Tool of Food Chemical Contamination: A Review. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *153*, 112306. [\[CrossRef\]](#)
179. Daisley, B.A.; Monachese, M.; Trinder, M.; Bisanz, J.E.; John, A.; Burton, J.P.; Reid, G.; Daisley, B.A.; Monachese, M.; Trinder, M.; et al. Immobilization of Cadmium and Lead by *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Mitigates Apical-to-Basolateral Heavy Metal Translocation in a Caco-2 Model of the Intestinal Epithelium. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 321–333. [\[CrossRef\]](#)
180. Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1401–1412. [\[CrossRef\]](#)

181. Davani-Davari, D.; Negahdaripour, M.; Karimzadeh, I.; Seifan, M.; Mohkam, M.; Masoumi, S.J.; Berenjian, A.; Ghasemi, Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* **2019**, *8*, 92. [[CrossRef](#)]
182. Long-Smith, C.; O’Riordan, K.J.; Clarke, G.; Stanton, C.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Microbiota-Gut-Brain Axis: New Therapeutic Opportunities. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2020**, *60*, 477–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Van Den Abbeele, P.; Taminiau, B.; Pinheiro, I.; Duysburgh, C.; Jacobs, H.; Pijls, L.; Marzorati, M. Arabinoxylo-Oligosaccharides and Inulin Impact Inter-Individual Variation on Microbial Metabolism and Composition, Which Immunomodulates Human Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 1121–1130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Perdijk, O.; Van Baarlen, P.; Fernandez-gutierrez, M.M.; Van Den Brink, E. Sialyllactose and Galactooligosaccharides Promote Epithelial Barrier Functioning and Distinctly Modulate Microbiota Composition and Short Chain Fatty Acid Production In Vitro. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 94. [[CrossRef](#)]
185. Daguet, D.; Pinheiro, I.; Verhelst, A.; Possemiers, S. Arabinogalactan and Fructooligosaccharides Improve the Gut Barrier Function in Distinct Areas of the Colon in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *J. Funct. Foods* **2016**, *20*, 369–379. [[CrossRef](#)]
186. Rose, E.C.; Odle, J.; Blikslager, A.T.; Ziegler, A.L. Probiotics, Prebiotics and Epithelial Tight Junctions: A Promising Approach to Modulate Intestinal Barrier Function. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Uerlings, J.; Schroyen, M.; Willems, E.; Tanghe, S.; Bruggeman, G. Differential Effects of Inulin or Its Fermentation Metabolites on Gut Barrier and Immune Function of Porcine Intestinal Epithelial Cells. *J. Funct. Foods* **2020**, *67*, 103855. [[CrossRef](#)]
188. Wongkrasant, P.; Pongkorpsakol, P.; Ariyadamrongkwan, J.; Muanprasat, C. Biomedicine & Pharmacotherapy Original Article A Prebiotic Fructo-Oligosaccharide Promotes Tight Junction Assembly in Intestinal Epithelial Cells via an AMPK-Dependent Pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110415. [[CrossRef](#)]
189. Wang, G.; Sun, W.; Pei, X.; Jin, Y.; Wang, H.; Tao, W.; Xiao, Z.; Liu, L.; Wang, M. Function Galactooligosaccharide Pretreatment Alleviates Damage of the Intestinal Barrier and inflammatory Responses in LPS-Challenged Mice. *Food Funct.* **2021**, *12*, 1569–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Smith, L.M.; Parr-Brownlie, L.C. A Neuroscience Perspective of the Gut Theory of Parkinson’s Disease. *Eur. J. Neurosci.* **2019**, *49*, 817–823. [[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.

MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

Etude in vivo (modèle rat)

En utilisant un modèle animal (*Rattus norvegicus*) d'exposition chronique au CPF (1 mg/kg/pc = NOAEL chez le rat) en supplémentation à l'inuline durant la période de gestation et périnatale, nous cherchons à comprendre **comment les résidus de pesticide :**

- **modifient l'équilibre des bactéries colonisant le tube digestif (dysbiose du MI) et provoquent une translocation bactérienne vers les organes stériles ?**
- **modulent l'expression des protéines de jonctions serrées, les molécules d'adhésion et les marqueurs d'inflammation de la BI et la BHE (microvaisseaux cérébraux) ?**
- **Comment la supplémentation en prébiotique (l'inuline) pourrait prévenir les effets de ces facteurs environnementaux ?**

Afin de répondre à ces questions, des rats femelles gestantes ont été exposées (selon la frise ci-dessous) par gavage au CPF (1mg/kg poids corporel, 5j/semaine), et à l'inuline (fibre alimentaire 3,73 mg $\pm$ 0,04 mg/g de poids corporel/jour).

Les animaux qui ont servi dans cette étude sont des rats de souche Wistar et ont été hébergés, au niveau de la plateforme PLATANN du CURS (Centre Universitaire de Recherche et Santé) de l'Université de Picardie Jules Verne. Les rats reçoivent l'eau fraîche et de la nourriture à leur convenance. Leur bien-être est suivi quotidiennement par l'expérimentateur. Les rates mères ont été anesthésiées puis sacrifiées après le sevrage des petits (jour 21). Les organes tels que le cerveau, le colon, le cæcum, la rate, le foie, le tissu adipeux mésentérique et gonadique étaient prélevés et conservés à -80 °C.

Cette étape d'expérimentation animale a été réalisée dans le cadre d'un projet précédant celui-ci. Cette partie in vivo de ma thèse est donc une continuité d'une étude précédente afin de s'approfondir dans les conséquences d'une éventuelle perturbation du MI sur les barrières.

A. Etude du MI

1. Etude de la dysbiose intestinale

Les segments intestinaux nous ont servi pour évaluer la dysbiose intestinale. Ainsi, après broyage manuel du colon, cæcum, foie, rate, tissu adipeux mésentérique et gonadique dans des sacs stomacher stériles avec 9 mL de solution de Ringer, les surnageant étaient récupérés et dilués à 10^{-1} pour être ensemencés sur différentes géloses à l'aide de billes de verres stériles. Après incubation à 37 °C pendant

24/48 heures en aérobie ou 72 h en anaérobie, les bactéries aérobies et anaérobies ont été comptées à l'aide du logiciel Scan.interscience. Nous avons identifié les souches bactériennes ayant poussé dans les autres organes outre les segments intestinaux. Ensuite le test de coloration Gram et des tests biochimiques ont permis d'identifier les souches comme les *Staphylocoques* (milieu MSA), *Entérobactéries* (milieu BCP) ou *Entérocoques* (milieu BEA).

2. Etude de la translocation bactérienne

Sur le plan phénotypique

Les différents phénotypes des bactéries ont été comparés entre les segments intestinaux (le colon et cæcum) et les organes externes grâce au test d'antibiogramme. Ainsi, une possible translocation pouvait être soupçonnée lorsqu'un même phénotype bactérien se retrouvait à la fois dans un segment intestinal et un organe externe. Les bactéries furent ensemencées dans les boîtes de Mueller-Hinton et mises en contact avec des antibiotiques spécifiques à la famille bactérienne suspectée afin de qualifier si la bactérie est sensible, intermédiaire, ou résistante à l'antibiotique. Nous avons également utilisé une méthode d'antibiogramme complémentaire et plus précise. De ce fait, nous avons utilisé des plaques d'antibiogramme (Sensititre, ThermoFischer) pour bactéries Gram + et Gram - permettant l'analyse de la sensibilité à différents antibiotiques. Les souches bactériennes pures ont ensuite été conservées en cryobilles pour l'étude de la translocation sur le plan génotypique.

Sur le plan génotypique

Les étapes globales de l'étude de la translocation bactérienne sur le plan génotypique sont les suivantes (Fig. 20).

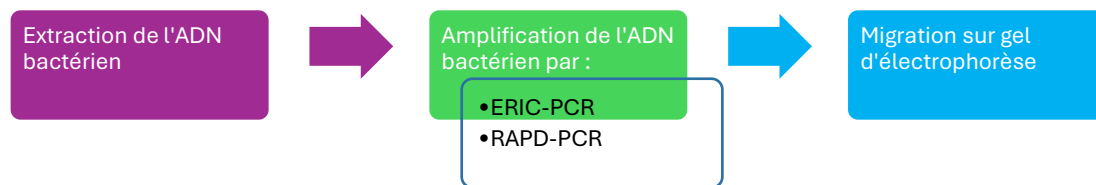


Figure 20: Etapes de l'étude de la translocation bactérienne sur le plan génotypique

Une souche est considérée comme avoir transloqué d'un segment intestinal vers un organe externe lorsque les bandes correspondantes aux bandes d'ADN de chaque souche déposée migrent à la même taille. Ces méthodes nous ont permis d'analyser nos résultats de translocation bactérienne en comparant

le profil des bactéries intestinales à celles ayant transloqué dans les organes stériles tel que le foie et la rate ([article in vivo de la partie résultats](#)).

Tests statistiques

Les données de composition bactérienne ont été exprimées en moyenne $\pm$ écart-type, sauf indication contraire. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels SPSS (version 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) et Stat View (version 5.0, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA). Des analyses de variance à un facteur (ANOVA) et à deux facteurs, ainsi qu'un test de chi-carré, ont été utilisés (Djekkoun et al. 2022a). Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$ pour toutes les analyses.

B. Etude de la BHE

1. Protocole d'extraction des microvaisseaux cérébraux

Les microvaisseaux cérébraux ont été extraits à partir du cerveau selon un protocole adapté de (Coisne et al. 2005), bien maîtrisé au laboratoire LBHE de Lens, afin d'extraire l'ARN et les protéines pour étudier respectivement par RT- q PCR et Western blot, au niveau de la BHE, l'expression des protéines des jonctions serrées : claudines 3 et 5, Zonula occludens 1 et occludine (amorces détaillées dans l'article de l'étude in vivo). Nous avons également étudié l'effet de ces deux facteurs sur l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) et des marqueurs d'inflammation (TLR4 et NLRP3) surtout chez les rats de la descendance tout en comparant mâles et femelles afin d'évaluer si les effets de cette exposition sont sexospécifiques.

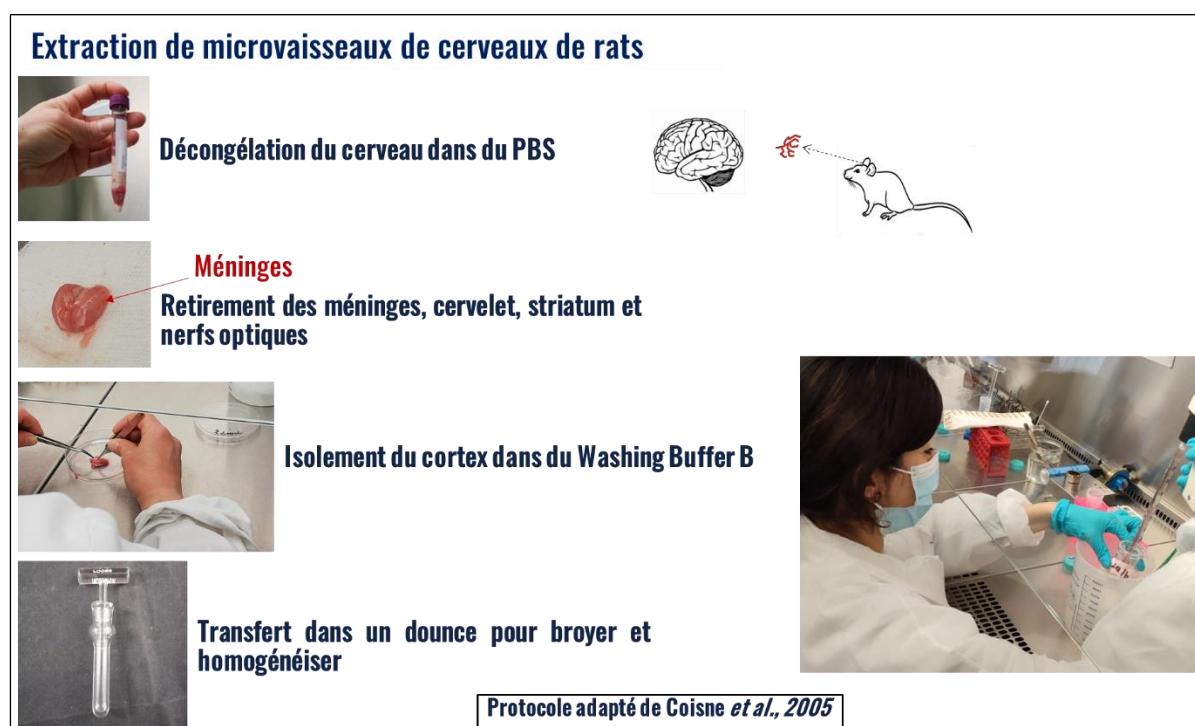


Figure 21: Etapes principales du protocole d'extraction des fractions de microvaisseaux enrichies en cellules endothéliales

2. Tests statistiques

Les données de l'analyse RT-qPCR et Western blot ont été présentées sous forme de moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel statistique GraphPad Prism 8.0.1 en utilisant une méthode ANOVA à deux facteurs. Un seuil de $p < 0,05$ a été fixé pour déterminer la signification statistique de toutes les analyses.

Etude in vitro (modèles in vitro humains)

Le but de cette approche est d'évaluer chez des femmes enceintes (vs contrôles), les perturbations au niveau de l'axe microbiote-intestin-cerveau causées par l'exposition chronique à un seul pesticide (le CPF) ou un mélange de pesticides. A cet effet, une approche intégrée in vitro est proposée (SHIME®, BHE, BI) pour : **(i) décrypter les mécanismes cellulaires impliqués dans les interactions de l'axe MI-BI-cerveau, et (ii) proposer une stratégie de prévention nutritionnelle via la co-exposition à un prébiotique (inuline).** Cette approche se base sur l'ensemencement de l'intestin artificiel par des fèces de femmes afin d'étudier l'effet des pesticides sur le MI et par la suite sur deux modèles de BI et BHE.

L'utilisation de modèles in vitro d'origine humaine revêt une importance cruciale pour élucider les mécanismes d'action de pesticides, identifier les cibles cellulaires spécifiques et développer des stratégies visant à atténuer les effets néfastes de ces substances. Pour ces raisons, nous avons utilisé différents modèles in vitro humains reproduisant la situation in vivo. Ces modèles sont utilisés en combinaison pour mimer l'axe microbiote-intestin cerveau.

A. Le modèle SHIME®

1. Installation et préparation du SHIME®

L'acronyme SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) désigne un modèle in vitro de culture bactérienne développé dans les années 1990 (Molly et al. 1993). Ce modèle a été conçu pour permettre une étude approfondie du MI et de son écosystème, distinct du microbiote fécal et difficile d'accès en raison de sa localisation. Le SHIME® est un modèle in vitro dynamique et multi-compartimenté, capable de recréer de manière très fidèle les conditions nécessaires (température, pH et potentiel rédox) au développement du MI humain (ou animal, selon le type de selles utilisées pour l'ensemencement). Son fonctionnement est contrôlé et surveillé par un boîtier de commande informatique. Il s'organise sous la forme d'une chaîne de 6 fermenteurs (allant de l'estomac jusqu'au colon descendant) à double paroi, reliés par des pompes péristaltiques permettant le transfert entre différents organes du tractus digestif, représenté chacun par un des fermenteurs.

Plusieurs solutions sont requises pour la réalisation d'un SHIME®. L'alimentation primaire constitue la solution la plus importante pour le modèle. Elle est, dans un premier temps, utilisée afin de remplir les différents fermenteurs avec des volumes définis, permettant de mimer les volumes réels des organes. Sa présence sert, grâce aux nombreux éléments nutritifs, de base nutritive pour les bactériesensemencées dans l'intestin artificiel.

De plus, le jus pancréatique mime le rôle du pancréas. Il est composé de différentes enzymes synthétisées par le pancréas (notamment la bile et la pancréatine) et servant à la digestion au sein du TGI. En recouvrant l'alimentation, les enzymes permettent de digérer les aliments et de basifier le pH dans les fermenteurs, grâce à la présence d'ions bicarbonate dans le jus pancréatique.

La mise en route du SHIME® nécessite un inoculum de fèces humaines. Nous avons utilisé un inoculum de fèces de minimum 5 femmes en âge de procréer et de 5 femmes enceintes (pour un TWIN-SHIME = double bras : mélange de 100 g de fèces provenant des 5 femmes dans 600 mL de solution physiologique). Le recrutement de femmes volontaires s'est fait avec l'aide du Dr. Arthur Foulon au CHU d'Amiens, selon l'accord du CERNI n° 2023-07-5/2023-27 (Comité d'éthique sur les recherches non interventionnelles).

Ensuite une stabilisation de 15 jours du MI (pH et potentiel redox) est requise avant le début de l'exposition au pesticide. Nous prélèverons les surnageants issus de la digestion *in vitro* au 15^{ème} jour de stabilisation qui représente le contrôle (CPF0); 15 j après l'exposition pour étudier l'effet à court-terme (CPF15); et 30j pour étudier l'effet à long-terme (CPF30). La durée d'un SHIME® est donc de 45 jours.

La préparation de la solution de pesticides se fait dans l'huile de colza. Nous préparons plusieurs pots de 10 mL d'une solution de CPF à 0,1 mg/mL (soit 1 mg dans chaque pot). L'ajout dans le SHIME® d'un pot d'alimentation primaire enrichie en pesticide, chaque jour (à heure fixe) permet d'exposer l'intestin artificiel de manière répétée à la dose souhaitée de 1 mg (concentration dans l'estomac (Fermenteur F1) : 1 mg dans 210 mL → **0,0048 mg/mL**).

Pour la solution cocktail, nous l'avons préparé avec une concentration à 0,1 mg/mL de CPF, 0,05 mg/mL de glyphosate et 0,025 mg/mL d'imazalil (25 µg/mL dans l'estomac).

2. Etude du MI du SHIME®

L'étude microbiologique a été réalisée par dénombrement de colonies bactériennes sur culture (des micro-organismes viables et cultivables) en aérobie et anaérobie, par qPCR et par dosage de métabolites bactériens (AGCC). En culture, nous avons étudié la flore totale aérobie et anaérobie, *Clostridium spp*, *Entérobactéries*, *Entérocoques*, *Lactobacillus* et *Bifidobactéries*. L'ADN bactérien est extrait en utilisant un protocole adapté du kit Maxwell RSC Buccal Swab (Promega).

En qPCR, nous avons également analysé les All bacteria, *Clostridium spp cluster I et VI* (pathogènes), *C. leptum*, les *Entérobactéries*, *Entérocoques*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobactéries spp* et *B. longum* (amorces dans le tableau 1). L'ADN bactérien est amplifié en utilisant le kit GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (Promega). Les données de PCR en temps réel pour chaque quantité de bactéries ont été

calculées par calcul relatif en utilisant la méthode delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Chen et al. 2019). Cette méthode a été utilisée pour calculer l'abondance relative de chaque groupe bactérien. La ΔCt a été calculée comme la différence entre la valeur Ct avec les amorces pour un groupe spécifique de bactéries et la valeur Ct avec les amorces pour les bactéries totales. La $\Delta\Delta Ct$ est définie comme la différence entre la valeur ΔCt de chaque traitement et la valeur ΔCt du contrôle (0 pesticide). Les valeurs dérivées de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ montrent la variation de l'abondance bactérienne dans un échantillon exposé au pesticide par rapport à l'échantillon contrôle. La valeur $2^{-\Delta\Delta Ct}$ des échantillons contrôle est égale à 1 après normalisation au contrôle lui-même.

Tableau 1: Amorces forward (F) et reverse (R) utilisées pour la q PCR de l'ADN bactérien du SHIME

Microorganismes	Gène cible	Amorces	Séquences
All eubacteria	16S rRNA	UniF	GTGSTGCAYGGYGTCTGCA
		UniR	ACGTCRTCCMCNCTTCCTC
<i>Clostridium spp.</i>	16S rRNA	Chis150F	AAAGGRAGATTAATACCGCATAA
		ClostIR	TTCTTCTAATCTCTACGCA
<i>Clostridium perfringens</i>	toxin α	plc (cpa)-F	GCTAATGTTACTGCCGTGA
		plc (cpa)-R	CCTCTGATACATCGTGAAG
<i>Clostridium difficile</i>	16S rRNA	Cdiff-F	CAAGTTGAGCGATTACTTCGGTAA
		Cdiff-R	CTAATCAGACGCGGGTCCAT
<i>C. coccoides group</i>	16S rRNA	Eub338-F	ACTCCTACGGGAGGCAGC
		Erec482-R	GCTTCTTAGTCANGTACCG
<i>Clostridial cluster IV (C. leptum group)</i>	16S rRNA	Clep866m-F	TTAACACAATAAGTWATCCACCTGG
		Clept1240m-R	ACCTTCCTCCGTTTGTCAAC
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	16S rRNA	FPR-2F	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG
		Fprau645R	AATCCGCCTACCTCTGCACT
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	16S rRNA	Bif164F	GGGTGGTAATGCCGGATG
		BiADO-2	CGAAGGGCTTGCTCCCACT
<i>Bifidobacterium longum</i>	16S rRNA	BlonF	CAGTTGATCGCATGGTCTT
		BlonR	TACCCGTCGAAGCCAC
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	16S rRNA	BiBiF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG
		BiBiF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCAAA
<i>Christensenella minuta</i>	16S rRNA	Cminuta-F	TTCGGGAGGAACTGTGGGTAT
		Cminuta-R	GGTTGCTCACGCGTACT

Les données de composition bactérienne par q PCR ont été exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel statistique GraphPad Prism 8.0.1 en utilisant une méthode ANOVA à deux facteurs. Un seuil de $p < 0,05$ a été fixé pour déterminer la signification statistique de toutes les analyses.

B. Le modèle de BI : cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont décongelées à 37 °C. Elles sont ensuite mises en présence d'un milieu complet DMEM-Caco-2 qui se compose de Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco, Thermo Fischer, France) à 4,5 g/L de glucose, complété de 10% de sérum de veau foetal (FCS, Sigma-Aldrich, non originaire des USA), 1% d'acides aminés non essentiels sans L-glutamine (Gibco, UK), et 1% de glutamine, avant d'être centrifugé 5 minutes à 200g et 4 °C. Après avoir suspendu le culot dans du milieu complet, les cellules Caco-2 sont mises en culture en flasque de 75 cm² (Corning, USA). Les cellules Caco-2 sont placées à l'incubateur à 37 °C et 5% de CO₂. Le milieu des cellules Caco-2 est changé tous les deux jours. Après trypsinisation, les cellules Caco-2 sontensemencées dans des inserts de culture cellulaire (Transwell, porosité 0,4 µm, Corning, USA) avec une densité de 100 000 cellules par filtre. Le milieu des cellules est à renouveler tous les deux jours. Les cellules Caco-2 sont prêtes 21 jours plus tard (Sevin et al. 2013, 2019).

C. Le modèle de BHE : modèle de co-culture

Le modèle in vitro de BHE humaine développé au sein du LBHE consiste en une co-culture de cellules endothéliales dérivées de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ issues de sang de cordon, co-cultivées avec des péricytes cérébraux (Cecchelli et al. 2014). Cette méthode crée un système bidirectionnel composé d'un compartiment luminal, représentant le côté sanguin, et d'un compartiment abluminal, simulant le côté cérébral.

Les cellules souches CD34⁺ sont isolées du sang de cordon humain, avec l'accord des donneurs et l'approbation du ministère français (CODECOH DC2011-1321). Les CD34⁺ sont ensuite différenciées en cellules endothéliales grâce à un milieu de culture enrichi (EGM-2 avec FCS et VEGF), sur des plaques prétraitées avec de la gélatine. Après une période de 15 à 20 jours, les cellules endothéliales obtenues sont congelées pour être utilisées ultérieurement.

Pour la co-culture, les cellules endothéliales différenciées sont décongelées, placées sur des filtres recouverts de Matrigel et co-cultivées avec des péricytes bovins. Ce processus dure 5 jours, durant lesquels les cellules acquièrent un phénotype endothélial spécifique à la BHE, appelé "brain-like endothelial cells" (BLECs). Le modèle ainsi formé est opérationnel pour des expériences jusqu'à 21 jours de culture, et des tests sont effectués pour s'assurer de l'absence de contamination par des mycoplasmes.

D. Mesure de la perméabilité dans les modèles de la BI et la BHE

L'intégrité des cellules épithéliales et endothéliales est évaluée par mesure de la diffusion d'une molécule hydrophile, le FITC-dextran 4 kDa (Sigma-Aldrich, Suède) à travers les barrières. Ce

marqueur est utilisé pour vérifier l'intégrité de la BI et de la BHE car il traverse peu ces barrières. La mesure est effectuée en point final d'une heure à 37°C et 5% de CO₂. Après les 24 heures d'exposition au SHIME® (dilution 1/5, mix des fermenteurs F4, F5 et F6, filtré et centrifugé), le compartiment luminal est incubé avec 0,5 mL d'une solution de FITC-dextran MW 4 kDa à 25 µM préparée dans du tampon Ringer-Hepes (RH ; NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ ; 6H₂O, NaHCO₃, Hepes, Glucose), alors que les fonds de puits contiennent 1,5 mL de tampon RH. Après l'heure d'incubation du marqueur d'intégrité, le contenu de chaque filtre est récupéré. La quantité de FITC-dextran MW 4 kDa est ensuite déterminée grâce à la mesure de la fluorescence à l'aide du spectrophotomètre (Synergy H1, Biotek). La longueur d'onde d'excitation/émission utilisée est égale à 432nm/538nm. A partir d'une courbe de calibration effectuée préalablement, nous déterminons les quantités de FITCdextran 4 kDa à partir des Unités de fluorescences Relatives. Les valeurs de fluorescence permettent ensuite de calculer la perméabilité apparente (P_{app}) en cm/s des cellules endothéliales ou Caco-2.

E. Etude de la viabilité cellulaire dans les modèles de la BI et la BHE par le test MTT

Le MTT est un dosage colorimétrique permettant de mesurer l'activité métabolique, indicateur de la viabilité cellulaire. Après traitement au SHIME, la viabilité des cellules endothéliales et des cellules Caco-2 est donc mesurée à l'aide du test MTT (Sigma-Aldrich, USA). Pour cela, 0,5 mL de solution de MTT à 1 mg/mL est incubée sur les cellules avec 1,5 mL de RH en fond de puits, jusqu'à la formation de cristaux de formazan violet. Ces cristaux apparaissent à la suite de la réduction du MTT par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives. Après la formation des cristaux, la solution est retirée avant d'y ajouter 250µL de dimethyl sulfoxide à 10% (DMSO) par filtre permettant de solubiliser les cristaux. L'absorbance est ensuite lue à 560 nm en utilisant le lecteur de plaque (Synergy H1, Biotek) afin de calculer la densité optique en pourcentage par rapport au contrôle.

F. Etude de la translocation bactérienne dans les modèles de la BI et la BHE

Pour vérifier si une dysbiose intestinale potentielle a conduit à une translocation bactérienne à travers la BI, nous avons appliqué des surnageants SHIME® dilués à 1/5 (colon distal seul F6 et un pool des trois segments du côlon, non filtrés) sur le côté apical du modèle IB pendant 4 heures, comme décrit précédemment (Réquilé et al. 2018). De plus, des inserts de modèle de BHE séparés ont été exposés pendant 4 heures à des aliquotes collectées du compartiment basolatéral des cellules Caco-2 après exposition au SHIME® pour imiter un axe "microbiote-intestin-BHE". Nous avons utilisé des méthodes de culture bactérienne pour détecter la translocation des bactéries qui ont traversé du compartiment apical vers le compartiment basolatéral des barrières. Les aliquotes apicales et basolatérales ont été inoculées sur des milieux de culture bactérienne et incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Si une translocation bactérienne se produit, des colonies sont détectées sur des boîtes de Pétri où des aliquotes

du compartiment basolatéral ont été inoculées. Les colonies résultantes ont été dénombrées à l'aide d'un système automatisé (Scan® 500, Inter-science, St Nom la Bretèche, France) et exprimées en log (Unité Formant Colonie UFC). Le pourcentage de translocation a été calculé en divisant le nombre de colonies dans le compartiment basolatéral par le nombre de colonies dans le compartiment apical et en multipliant par 100.

Pendant les 4 heures de translocation bactérienne, nous mesurons également la perméabilité au FD4 afin de mieux comprendre l'atteinte de l'intégrité de la barrière après l'exposition aux échantillons non filtrés.

Cependant, dans le cas de la barrière exposée au SHIME® filtrés pendant 24 heures, le but n'est pas d'étudier la translocation de bactéries mais l'effet des métabolites bactériens sur la barrière. De plus, l'exposition pendant 24 heures permet d'étudier le changement d'expression des jonctions serrées mais aussi de l'effet sur les cytokines pro-inflammatoires à long terme.

L'étude in vitro a fait l'objet d'un article méthodologique. Les résultats présentés dans cet article ont validé la méthodologie de la combinaison de trois modèles in vitro humains reproduisant fidèlement l'axe microbiote-intestin-cerveau.

Résumé

L'axe microbiote-intestin-cerveau représente un réseau de communication complexe et dynamique entre le tractus gastro-intestinal (TGI) et le système nerveux central (SNC). Comprendre cette interaction est crucial pour élucider les effets de divers facteurs environnementaux, y compris les contaminants alimentaires, sur la santé humaine. Les modèles traditionnels in vivo soulèvent souvent des préoccupations éthiques et peuvent ne pas capturer pleinement les réponses spécifiques à l'humain. Dans cette étude, nous présentons une combinaison novatrice de trois modèles in vitro bien établis : le simulateur de l'écosystème microbien intestinal humain (SHIME®) simulant le microbiote intestinal (MI), le modèle de barrière intestinale (BI) Caco-2, et un modèle de co-culture de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Pour valider cette configuration de trois modèles, nous avons évalué la stabilité du modèle SHIME en surveillant la température, le pH et le potentiel redox, garantissant qu'il simule avec précision l'environnement intestinal humain. La viabilité et la perméabilité des modèles Caco-2 et BHE ont été évaluées après 24 heures d'incubation avec les surnageants de SHIME®. De plus, une coloration par immunofluorescence des protéines des jonctions serrées ZO-1 et occludine a été réalisée pour évaluer l'intégrité des barrières.

Nos résultats démontrent que le modèle SHIME® a maintenu des conditions physiologiques stables, tandis que les modèles Caco-2 et BHE ont montré une haute viabilité cellulaire et une fonction de barrière préservée. L'expression et la localisation de ZO-1 et d'occludine sont restées intactes, indiquant que les surnageants de SHIME® n'ont pas compromis l'intégrité des jonctions serrées.

Ce système intégré in vitro offre une approche plus éthique et pertinente pour l'homme pour étudier l'axe MI-BHE, fournissant des informations précieuses sur les effets des contaminants alimentaires, en tant qu'alternative aux modèles animaux. Nos résultats soulignent le potentiel de cette combinaison novatrice pour faire progresser la recherche dans ce domaine et contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Article de l'approche in vitro

L'article est en cours de rédaction et en vue de soumission dans le Journal of Controlled Release (IF : 10.5) en novembre 2024.

A novel in vitro human models' combination: are we closer to mimicking the gut-brain axis?

Maria Abou Diwan^{1,2#}, Juliette Poiriez^{2#}, Avénie Huet³, Claire-Joly Condette¹, Stéphane Delanaud¹, Emmanuel Sevin², Halima Ouadid-Ahidouch³, Véronique Bach¹, Fabien Gosselet², Hafida Khorsi-Cauet^{1, †} and Pietra Candela^{2, *, †}

¹ PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01 UPJV/INERIS, Centre Universitaire de Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens, France

² Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300 Lens, France

³ Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire (LPCM), UR UPJV 4667, Université Picardie Jules Verne, UPJV, 80039 Amiens, France

[#] First co-authors contributed equally to this work.

[†] These authors contributed equally to this work.

A novel in vitro human models' combination: are we closer to mimicking the gut-brain axis?

Maria Abou Diwan^{1,2#}, Juliette Poiriez^{2#}, Avénie Huet³, Claire-Joly Condette¹, Stéphane Delanaud¹, Emmanuel Sevin², Halima Ouadid-Ahidouch³, Véronique Bach¹, Fabien Gosselet², Hafida Khorsi-Cauet^{1,†} and Pietra Candela^{2,*†}

¹ PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01 UPJV/INERIS, Centre Universitaire de Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens, France

² Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300 Lens, France

³ Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire (LPCM), UR UPJV 4667, Université Picardie Jules Verne, UPJV, 80039 Amiens, France

First co-authors contributed equally to this work.

† These authors contributed equally to this work.

Abstract

The gut-brain axis represents a complex and dynamic communication network between the gastrointestinal tract (GIT) and the central nervous system (CNS). Understanding this interaction is crucial for elucidating the effects of various environmental factors, including food contaminants, on human health. Traditional in vivo models often raise ethical concerns and may not fully capture human-specific responses. In this study, we present a novel combination of three well-established in vitro models: the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) simulating the gut microbiota (GM), the Caco-2 intestinal barrier (IB) model, and a blood-brain barrier (BBB) co-culture model. To validate this 3 models' configuration, we assessed the stability of the SHIME model by monitoring temperature, pH, and redox potential, ensuring it accurately simulates the human gut environment. The viability and permeability of the Caco-2 and BBB models were evaluated after 24 hours of incubation with SHIME® supernatants. Additionally, immunofluorescence staining for tight junction proteins ZO-1 and occludin was performed to assess barriers integrity. Our results demonstrate that the SHIME® model maintained stable physiological conditions, while the Caco-2 and BBB models exhibited high cell viability and preserved barrier function. The expression and localization of ZO-1 and occludin remained intact, indicating that the SHIME® supernatants did not compromise tight junction integrity. This integrated in vitro system offers a more ethical and human-relevant approach to studying the GM-BBB axis, providing valuable insights into the effects of food contaminants, as an alternative to animal models. Our findings highlight the potential of this novel combination to advance research in this field and contribute to the development of new therapeutic strategies.

Keywords: human in vitro models, SHIME® model, IB model, Caco-2 cells, BBB model, human brain-like cells, human brain pericytes, Gut-microbiota-BBB axis

* Corresponding author. e-mail address: pietra.candela@univ-artois.fr

1. Introduction

The intricate relationship between the gut and the brain, often referred to as the gut-brain axis, has garnered significant attention in recent years. This bidirectional communication system involves the gut microbiota (GM)—the diverse community of microorganisms residing in the gut—and the barriers that separate it from the rest of the body (Morais et al. 2021). These barriers include the intestinal barrier (IB), which limits the absorption of food

contaminants, and the blood-brain barrier (BBB), which restricts the entry of harmful molecules and cells into the brain (Daneman and Rescigno 2009; Abou Diwan et al. 2023). This axis of communication was long overlooked in medical and scientific research, but in recent decades, extensive studies have uncovered its critical role in both mental and physical health.

To study this complex interaction, researchers have developed several *in vitro* models that simulate different aspects of the human body.

One such model is the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®), which replicates the human GM environment (Molly et al. 1993; Van de Wiele et al. 2015). This model allows for the study of microbial composition, metabolic activities, and interactions within the gut, providing valuable insights into how the GM influences health and disease (Šuligoj et al. 2020; Joly Condette et al. 2022; Di Vincenzo et al. 2023).

Another well-established model is the IB model based on Caco-2 cells that was developed in 1977 (Fogh et al. 1977; Ding et al. 2021). Derived from human colorectal adenocarcinoma cells, Caco-2 cells spontaneously differentiate into a monolayer that mimics the intestinal epithelium when cultured under specific conditions. The Caco-2 model gained prominence and has since become a standard tool for investigating drug transport, nutrient absorption, and the effects of various compounds on the IB (Sevin et al. 2013, 2019; Al-Sadi et al. 2019).

The development of BBB *in vitro* models began in the early 1990s and was crucial for understanding the selective permeability of the brain's vasculature (Abbott et al. 2010; Spadoni et al. 2016; Versele et al. 2022). Over time, more sophisticated *in vitro* models using the Transwell system were developed, incorporating co-cultures of endothelial cells from human umbilical cord with human brain pericytes (hBP) and astrocytes to better mimic the neurovascular unit (Shimizu et al. 2011; Cecchelli et al. 2014; Rizzi et al. 2021; Menaceur et al. 2023). This model helps in studying the transport of substances between the bloodstream and the brain, as well as the protective mechanisms that prevent harmful compounds from entering the brain (Saint-Pol et al. 2020; Jagtiani et al. 2022). Despite the advancements in these individual models, there remains a need for a more comprehensive approach to study the gut-brain axis. Here, we introduce a novel combination of the SHIME® model, the IB model, and the BBB model. This integrated system allows for a more holistic assessment of the effects of food contaminants, such as pesticide residues, on the gut-BBB axis. By combining these models, we can better mimic the complex interactions between the GM, IB, and BBB. Our primary objective is to validate this integrated approach by assessing the stability of the SHIME® model and evaluating the permeability and viability of Caco-2 cells and the BBB after exposure to SHIME® supernatants. Our secondary objective is to demonstrate that this combination of models allows for the study of the effects of food contaminants. Specifically, we investigated the effects of the organophosphate insecticide Chlorpyrifos (CPF), whose impacts have been well-documented using the SHIME® model alone (Reygner et al. 2016a; Réquillé et al. 2018; Joly Condette et al. 2022). By introducing CPF into the SHIME® model, we can observe the effects on the IB and BBB after CPF has been biodegraded in the SHIME® reactors. This approach enables us to examine the consequences of CPF on the GM and its subsequent impact on the barriers.

The novelty of this study lies in its pioneering integration of three distinct *in vitro* models—the SHIME® model, the IB model, and the BBB model—to create a comprehensive system for studying the gut-brain axis. This is the

first time such a combination has been used to assess the effects of food contaminants. By simulating the complex interactions between the GM, IB, and BBB, this integrated approach provides a more accurate and ethical alternative to animal models.

2. Materials and Methods

2.1 In vitro models

SHIME® model

The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) (Van de Wiele et al. 2015) was developed in 1993 by Molly et al. at Ghent University (Molly et al. 1993). This dynamic simulator was designed to replicate the human gastrointestinal tract (GIT), including the stomach, small intestine, and different regions of the colon. The SHIME model evolved from earlier single stage chemostats and semi-continuous fermenters, which were limited in their ability to maintain stable microbial communities over time. By incorporating multiple compartments, the SHIME® model currently contains 6 different double-wall reactors and better simulate the complex and heterogeneous environment of the human gut, allowing for more accurate studies of microbial composition and metabolic activities (Réquillé et al. 2018; Joly Condette et al. 2022). Peristaltic pumps connect these fermenters that are maintained at a constant temperature of 37°C and monitored pH and redox voltage.

The model initiation requires a human feces inoculum. This research targeted women individuals. Our criteria of inclusion selected five healthy adults' volunteers: without any symptoms of gastrointestinal diseases and who had not taken antibiotics in the six months preceding feces collection. The collection of women feces from the Amiens University Hospital, with the help of Dr. Arthur Foulon, and their inoculation in the SHIME® were approved by the Ethical committee for non-interventional research (CERNI) of Picardy Jules Verne University (Evaluation number 2023-07-5/2023-27).

A 15-day stabilization period of the microbiota (pH and redox potential) is required before beginning exposure. Supernatants from the in vitro digestion were collected on the 15th day of stabilization, representing the control, as well as 15 days and 30 days post-exposure to study respectively short-term and long-term effects of CPF (a 0.1 mg/mL solution of CPF was added to the first reactor (stomach) containing 200 mL of sterile feed medium (Joly Condette et al. 2022)). The supernatants were sampled three times in the final week of each period to allow statistical analysis.

Stability Analysis of the SHIME® Model

To assess the stability of the SHIME® model, we monitored key physiological parameters including temperature, pH, and redox voltage. The system was maintained at a constant temperature of 37°C to simulate human body conditions. pH levels were measured at regular intervals (twice a day) using pH meters. Electrodes constantly

detected pH and redox potential in colon reactors, ensuring they remain within the physiological range of the human gut (**Fig. 1**).

Intestinal barrier model

The protocol for culturing Caco-2 cells has been extensively described in previous studies by our colleagues (**Fig. 1**) (Sevin et al. 2013, 2019). For this study, Caco-2 cells at passage 026 were initially seeded at a density of 0.4×10^5 cells in 25 cm² plastic flasks. These cells were maintained in a complete medium, which was replenished every two days. The medium used was Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with high glucose (4500 mg/L) and L-glutamine (584 mg/L), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FCS, Life Technologies, Waltham, MA, USA), 1% non-essential amino acids (excluding L-glutamine), and 1% penicillin-streptomycin solution.

After an incubation of three days, when 80–90% cells confluence was reached, they were trypsinized and reseeded at a density of 5×10^5 cells in 75 cm² flasks containing the same complete medium. Once the Caco-2 cells achieved a high density (approximately 0.5×10^5 cells/cm²) after 5 to 6 days, they were transferred to 6-well plates with 0.4 µm or 1 µm polycarbonate or polyethylene terephthalate membrane inserts. Cells were seeded at densities of 40,000 cells/cm² and cultured for 21–25 days in complete medium, with the medium being changed every two days.

Human in vitro BBB model

The BBB model was established using a co-culture system comprising human brain pericytes (hBPs) in the lower compartment and human brain-like endothelial cells (hBLEC) on the Transwell insert. The hBPs were provided by Professor Takashi Kanda's team at the Department of Neurology and Clinical Neuroscience, Yamaguchi University, Japan (Shimizu et al. 2011). These cells were isolated following the Declaration of Helsinki guidelines, with the protocol approved by the ethics committee of the Medical Faculty at Yamaguchi University (IRB#: H18-033-6). The hBPs were characterized for pericyte markers as detailed in previous studies (Menaceur et al. 2023). After thawing, hBPs (passages 15-25) were cultured in gelatin-coated Petri dishes using DMEM high glucose medium supplemented with FCS, L-glutamine, and antibiotics.

In accordance with the consent and approval from the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321), human hematopoietic stem cells were isolated from umbilical cord blood (Cecchelli et al. 2014; Heymans et al. 2020). These cells were sorted, cultured, and differentiated into endothelial cells (ECs) in EGM-2 medium containing VEGF (PeproTech Inc, Cranbury, NJ, USA). For the BBB model, hBPs were seeded in gelatin-coated dishes, while CD34⁺ ECs were seeded on inserts (1 µm, SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) coated with Matrigel™ (Corning, NY, USA). After six days of co-culture in a 12-well plate (Costar, 3512, Corning, NY, USA), the BBB model was ready for exposure to SHIME® supernatants (**Fig. 1**).

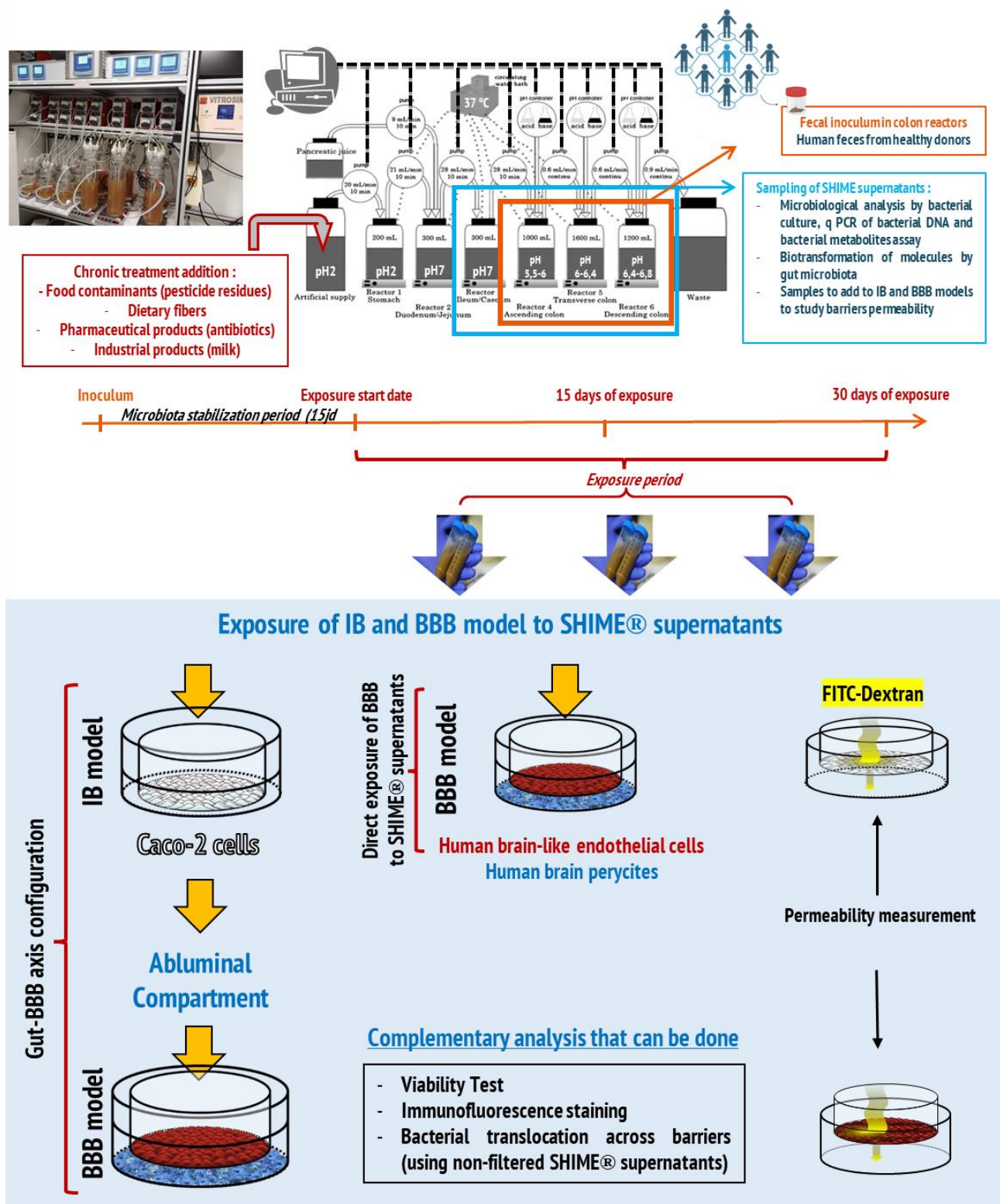


Fig. 1 Experimental design and in vitro methodology

2.3 Permeability and viability of IB and BBB models

Caco-2 cells and the endothelial cells of the BBB co-culture model were incubated with filtered and centrifuged SHIME® supernatants for 24 hours. The integrity of epithelial and endothelial cells was assessed by measuring the diffusion of a hydrophilic molecule, FITC-dextran 4 kDa (FD4) (Sigma-Aldrich, Sweden), across the barriers. This marker is used to verify the integrity of the IB and the BBB because it minimally traverses these barriers. The measurement was performed at the endpoint of one hour at 37°C and 5% CO₂.

After 24 hours of exposure to SHIME®, the luminal compartment was incubated with 0.5 mL of a 25 µM FD4 solution prepared in Ringer-Hepes buffer (RH; NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O, NaHCO₃, Hepes, Glucose), while the basolateral wells contained 1.5 mL of RH buffer. After one hour of incubation with the integrity marker, the contents of each filter were collected. The amount of FD4 was then determined by measuring fluorescence using a spectrophotometer (Synergy H1, Biotek). The excitation/emission wavelength used was 432 nm/538 nm. Based on a previously established calibration curve, the quantities of FD4 were determined from the Relative Fluorescence Units (RFU). The fluorescence values were then used to calculate the apparent permeability (P_{app}) in cm/s of the endothelial or Caco-2 cells. Apparent permeability (P_{app}) to FITC-dextran was determined as previously published (Sevin et al. 2019).

Cell viability was assessed using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay as previously described (Sevin et al. 2019; Versele et al. 2022), which measures mitochondrial metabolic activity as an indicator of cell health. Following treatment with SHIME® supernatants, the viability of endothelial cells and Caco-2 cells was assessed using the MTT assay (Sigma-Aldrich, USA). For this assay, 0.5 mL of a 1 mg/mL MTT solution was incubated with the cells, along with 1.5 mL of Ringer-Hepes (RH) buffer in the basolateral wells, until the formation of purple formazan crystals. These crystals form as a result of the reduction of MTT by mitochondrial succinate dehydrogenase in metabolically active cells.

After crystal formation, the solution was removed, and 250 µL of 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) was added per filter to solubilize the crystals. Absorbance was then measured at 560 nm using the spectrophotometer (Synergy H1, Biotek) to calculate the optical density as a percentage relative to the control.

2.4 Immunofluorescence Analysis

To evaluate the integrity of tight junctions, immunofluorescence staining was performed for ZO-1 and occludin, key proteins involved in maintaining barrier function. Cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and incubated with primary antibodies against ZO-1 (Invitrogen) and occludin (Invitrogen). After washing, cells were incubated for 1h with fluorescently labeled secondary antibodies (Alexa Fluor™ 488 or 568 anti-rabbit, Invitrogen) (Versele et al. 2020). Fluorescence (Leica) and confocal (Agilent) microscopes were used to visualize and quantify the expression and localization of these proteins in endothelial cells and Caco-2 cells respectively.

2.5 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 8.0.1 statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). One-way and two-way analyses of

variance (ANOVA) were employed, with $p < 0.05$ being the statistical significance threshold for all analyses. When statistical analysis showed non-parametric values, data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) using the non-parametric test Kruskal-Wallis test.

3. Results

3.1 Assessment of SHIME® model stability

To evaluate the stability of the SHIME® system during the GM stabilization and exposure periods, we monitored variations in temperature, pH, and redox potential. As previously described by our colleagues, the SHIME® model consistently demonstrated stability across all experiments (Reygner et al. 2016a; Joly Condette et al. 2022). This stability was ensured through routine monitoring of pH and redox potential, as well as maintaining a constant temperature (37 °C) using a controlled water bath that circulates water through the double walls of the reactors. Our daily measurements in the proximal (ascending), transverse, and distal (descending) colon compartments demonstrated stable temperature evolution, reflecting system stability (**Fig. 2A**). Additionally, we observed stable pH (**Fig. 2B**) and redox potential (**Fig. 2C**), indicating the stability of the microbial flora. The initial pH value corresponded to the acidic pH of the artificial supply (sterile feed medium). After the addition of fecal samples, we began daily pH adjustments, resulting in consistent pH levels in the colon reactors: 5.5-6 in Asc colon, 6-6.4 in the Trans colon, and 6.4-6.8 in the Desc colon. Similarly, the redox potential was initially greater than 0 at the start (inoculum) but rapidly decreased due to the addition of H₂, N₂ and CO₂ to ensure anaerobic conditions in colon, reaching levels below - 200 mV. The redox potential remained constant, staying below - 300 mV in Trans and Desc colon and between - 300 mV and - 200 mV in Asc colon. This stability confirms the efficiency of our system assembly, ensuring leak-proof reactors, as we only needed to add gas once and did not require additional gas during the 45 days of SHIME® experiments. These conditions allowed the growth of strict anaerobes and facultative aerobes.

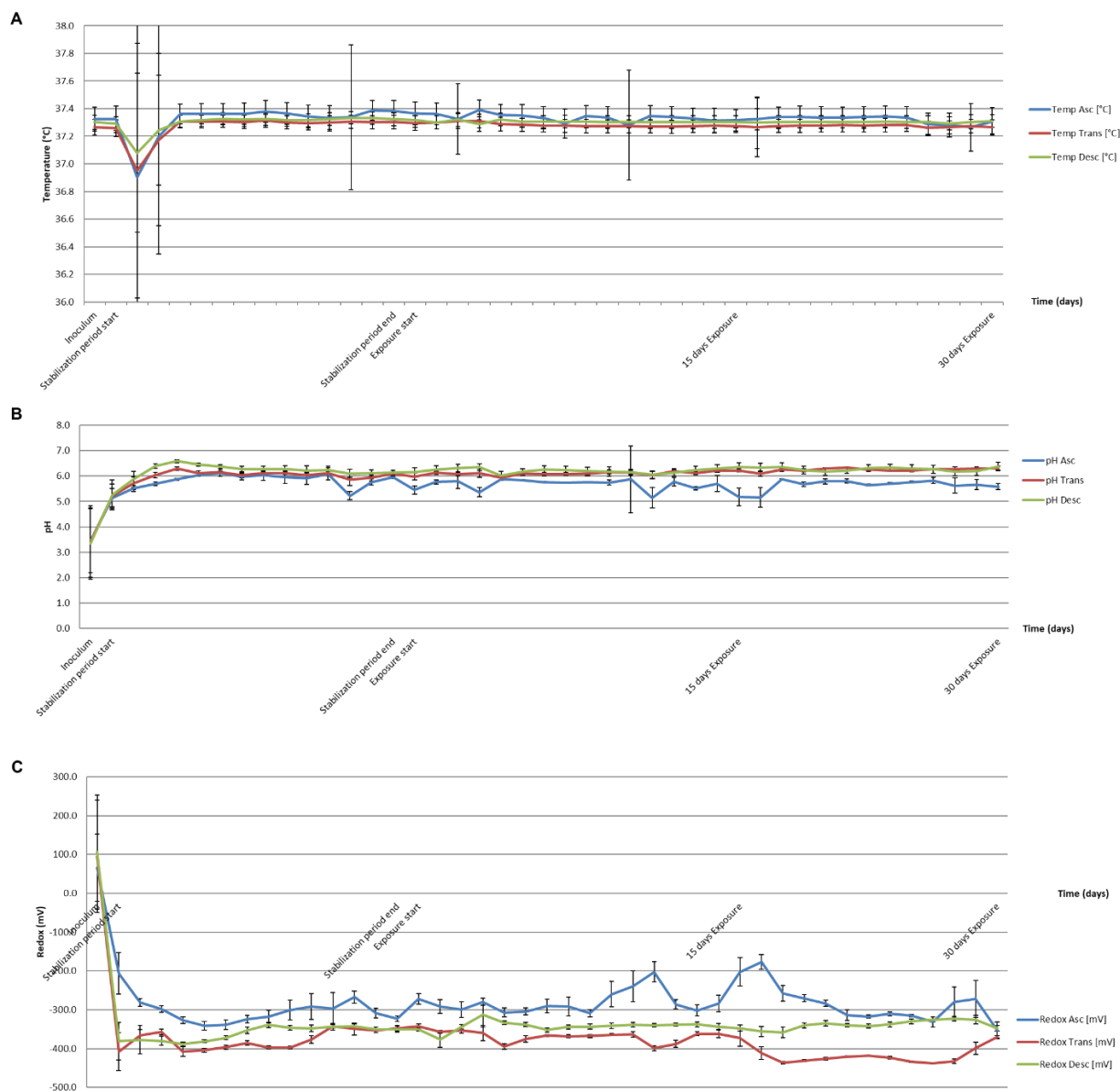


Fig. 2 Daily monitoring of temperature (A), pH (B) and redox voltage (C) from start date (inoculum) until 30 days of exposure to the pesticide. (Asc : ascending or proximal colon, Trans: Transverse colon, Desc : descending or distal colon)

3.2 Viability and Apparent Permeability of Caco-2 and BBB Models

To ensure that the addition of SHIME® supernatants (a mix of colon reactor samples) is not toxic to Caco-2 and endothelial cells, we evaluated cell viability and their apparent permeability to FITC-dextran after 24 hours of exposure to filtered and centrifuged SHIME® supernatants (both non-diluted and at a 1/5 dilution). Exposure of Caco-2 cells to non-diluted SHIME colon mix (+ SHIME ND) significantly increased the P_{app} to FD4 from 0.03 to 8.77×10^{-6} cm/s ($p < 0.01$ compared to control (- SHIME)) (**Fig. 3.A**). In contrast, the 1/5 dilution of SHIME®

supernatants (+SHIME 1/5) resulted in P app levels similar to the control, suggesting that 1/5 dilution of SHIME maintains the integrity of the IB.

Similarly, we observed comparable variations in endothelial cells, confirming that the 1/5 dilution is the most suitable concentration for combining SHIME® supernatants with both Caco-2 and endothelial cells. Figures 3.B and D show that there was no significant effect of CPF on the P app after 15 and 30 days of exposure in both models.

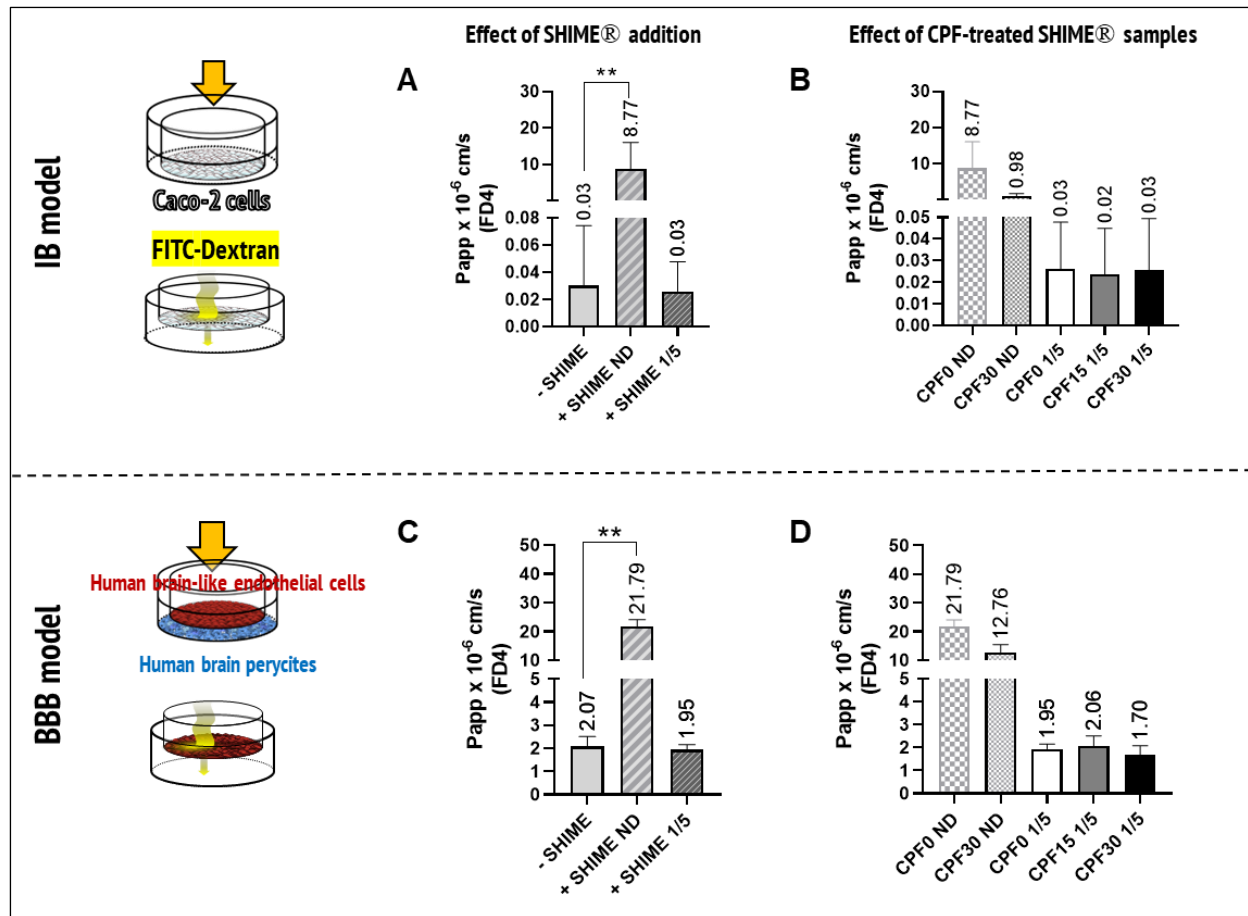


Fig. 3 Effect of SHIME® supernatants (a mix of colon reactor samples) and CPF-treated SHIME (ND and 1/5 dilution) on apparent permeability (P app 10⁻⁶ cm/s FD4) to FITC-Dextran in IB and BBB models. Data is illustrated as mean ± SD using analysis of variance (ANOVA). Significance * p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001. – SHIME: without SHIME addition = control, + SHIME ND: non-diluted, + SHIME 1/5: dilution of SHIME to 1/5, CPF0: Control; CPF15: 15 days of exposure; CPF30: 30 days of exposure

In the subsequent analysis, we excluded the non-diluted SHIME experiments and focused on the effects of the 1/5 diluted SHIME. The MTT assay results indicated a significant 37% increase in Caco-2 cell viability compared to the control (p < 0.05) after 24 hours of exposure to the 1/5 diluted SHIME. Conversely, a 24-hour exposure to the

1/5 diluted SHIME significantly decreased the viability of endothelial cells, which is expected since the BBB should not be in direct contact with the GM.

Figures 4.B and 4.D illustrate that CPF significantly reduced Caco-2 cell viability after 30 days of exposure, while it had no effect on endothelial cells.

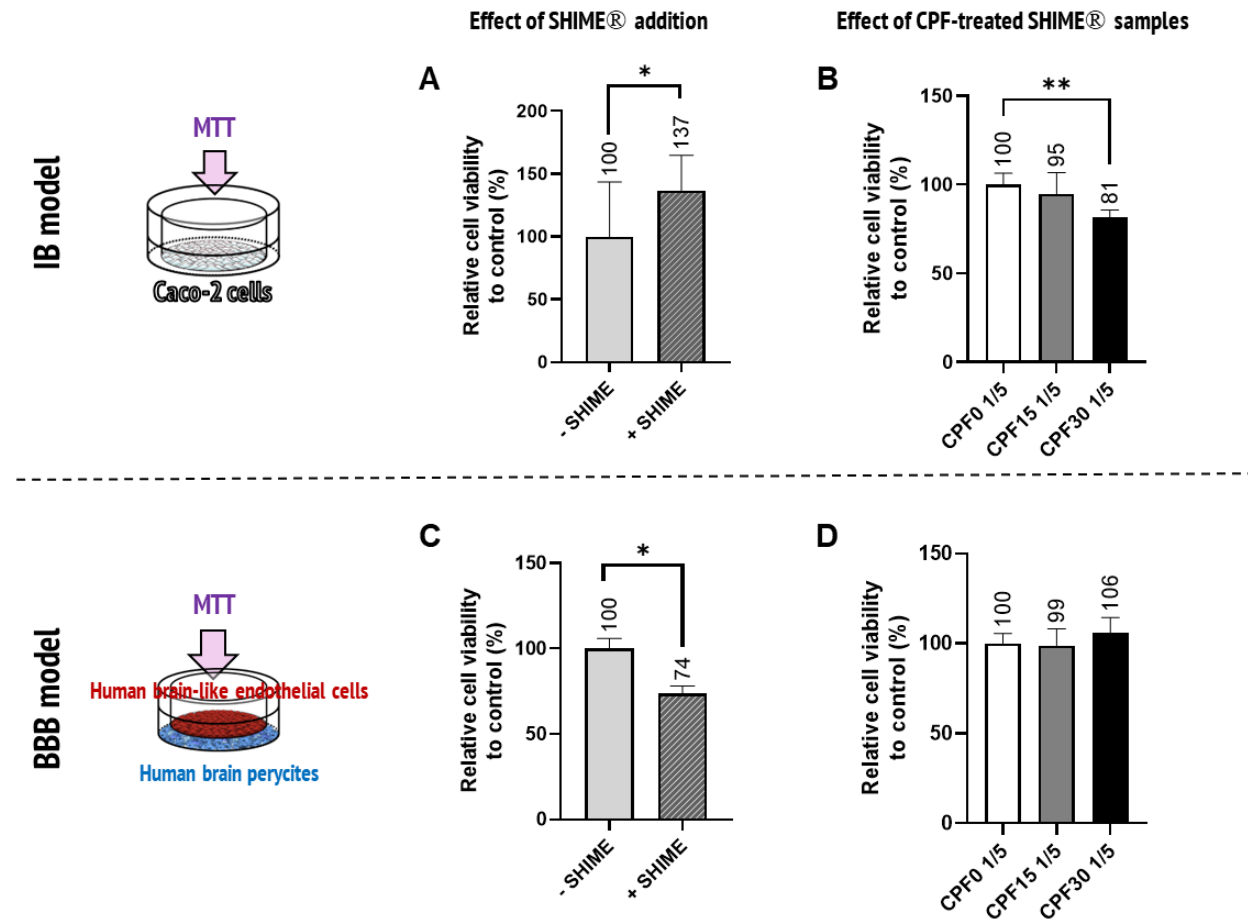


Fig. 4 Effect of SHIME® supernatants (1/5 dilution of a mix of colon reactor samples) and CPF-treated SHIME (1/5 dilution) on relative cell viability Caco-2 and endothelial cells. Data is illustrated as mean $\pm$ SD using unpaired t-test (with Welch's correction) and analysis of variance (ANOVA). Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. – SHIME: without SHIME addition = control, + SHIME 1/5: dilution of SHIME to 1/5, CPF0: Control; CPF15: 15 days of exposure; CPF30: 30 days of exposure

3.3 Immunofluorescence of tight junctions (Occludin) and associated proteins (ZO-1)

Confocal microscopy analysis of occludin (tight junction protein) and ZO-1 (associated with tight junctions) in Caco-2 cells exposed to SHIME® supernatants (1/5 dilution without CPF) revealed that occludin (red) was consistently localized along the cell membrane (**Fig. 5**), indicating intact tight junctions. This suggests that the

addition of SHIME® supernatants, devoid of pesticide residues, does not affect tight junction localization in Caco-2 cells membrane.

In contrast, exposure to CPF-treated SHIME® supernatants (CPF15 and CPF30) resulted in discontinuous staining of occludin indicated by white arrows (**Fig. 5B** and **5C**) and ZO-1 (**Fig. 5E** and **5F**) along the membrane, showing disruption of tight junctions due to CPF exposure, even though the apparent permeability (P_{app}) of Caco-2 cells was not significantly increased compared to CPF0 SHIME® samples.

Similarly, fluorescence microscopy of endothelial cells exposed to SHIME® supernatants (1/5 dilution without CPF), showed that ZO-1 (green) was consistently localized along the cell membrane (**Fig. 5G**), indicating intact tight junctions. This suggests that the addition of SHIME® supernatants, free from pesticide residues, does not impact ZO-1 localization in endothelial cells membrane. However, after exposure to CPF-treated SHIME® supernatants (CPF15 and CPF30), ZO-1 staining became faded and discontinuous (**Fig. 5H** and **5I**), indicating disruption of tight junctions by CPF exposure, even though the P_{app} of endothelial cells was not significantly increased compared to CPF0 SHIME® samples.

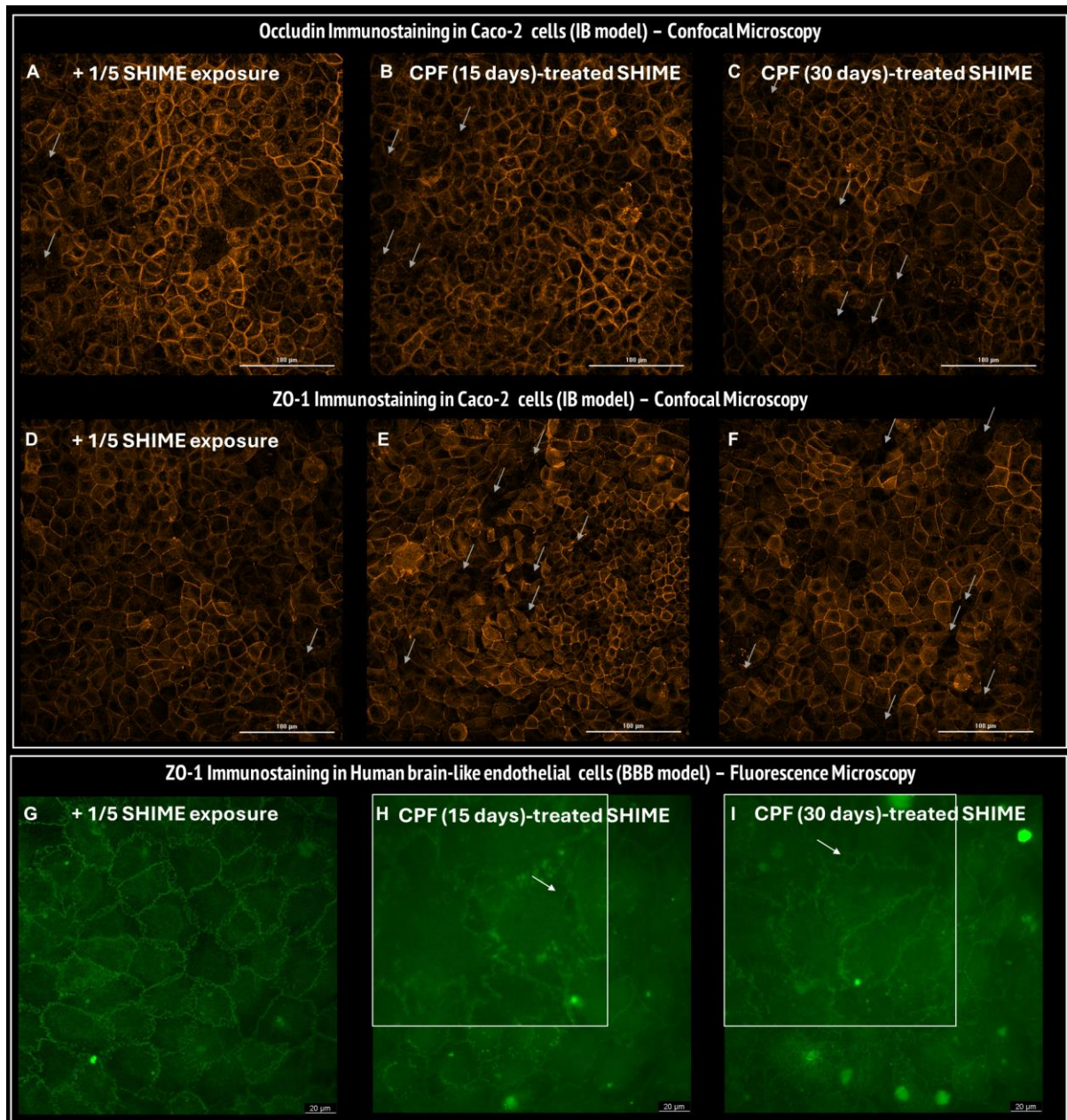


Fig. 5 Effect of SHIME® supernatants (1/5 dilution of a mix of colon reactor samples) and CPF-treated SHIME (1/5 dilution) on Occludin (red) and ZO-1 (red) in Caco-2 (confocal microscopy, scale bar = 100 μM) and ZO-1 (green) in endothelial cells (fluorescence microscopy, scale bar = 20 μM). White arrows indicate discontinuous staining.

+ SHIME 1/5: dilution of SHIME to 1/5, CPF15: 15 days of exposure; CPF30: 30 days of exposure

4. Discussion

4.1 Innovative and robust in vitro approach

The stability of the SHIME® system during the GM stabilization and exposure periods was rigorously evaluated through continuous monitoring of temperature, pH, and redox potential. Consistent with previous studies (Reygner et al. 2016a; Joly Condette et al. 2022), our findings reaffirm the robustness of the SHIME® model. The system maintained a constant temperature of 37°C, facilitated by a controlled water bath circulating through the double walls of the reactors. Daily measurements across the proximal, transverse, and distal colon compartments confirmed stable temperature profiles, indicative of system reliability. In addition, initial pH values reflected the acidic nature of the sterile feed medium. Following the introduction of fecal samples, daily pH adjustments were implemented, resulting in stable pH levels within the colon reactors. This consistency in pH is crucial for maintaining the appropriate environment for microbial activity. Moreover, the redox potential initially exceeded 0 mV due to the presence of dioxygen in reactors but rapidly decreased with the addition of H₂, N₂, and CO₂ to establish anaerobic conditions. The redox potential stabilized below -200 mV in colon reactors. The leak-proof nature of the reactors was confirmed by the minimal need for additional gas, ensuring a controlled environment conducive to microbial growth. This stability underscores the effectiveness of our system in maintaining anaerobic conditions, essential for the growth of strict anaerobes and facultative aerobes. These findings validate the SHIME® system as a reliable model for studying gut microbiota dynamics under controlled conditions.

Furthermore, the tested SHIME® dilution, maintained P app levels in both Caco-2 and endothelial cells comparable to the control, indicating that this dilution preserves the integrity of the IB and the BBB, as confirmed by immunofluorescence staining of tight junctions. Notably, this dilution significantly increased Caco-2 cell viability, underscoring the beneficial interaction between GM and intestinal cells. Conversely, the observed decrease in endothelial cell viability aligns with the expectation that direct exposure of the BBB to GM may compromise its phenotype. Therefore, further dilution should be considered, or our experimental approach should be refined to integrate the three models more realistically. Instead of directly exposing the BBB to diluted SHIME®, we exposed Caco-2 cells to SHIME® and then exposed the BBB to the basolateral compartment of the Caco-2 cells. This configuration more accurately reflects the physiological interactions within the gut-brain axis, as described in our published in vitro study on the effect of CPF and inulin on the axis ([reference to previous in vitro article](#)).

In fact, the gut-brain axis is influenced by systemic factors such as hormones, metabolites, and immune signals. Incorporating these systemic influences into in vitro models is complex but necessary for a comprehensive understanding of gut-brain interactions. The combination of the SHIME model with the barrier model may allow these systemic influences ensured by intestinal and endothelial cells. This innovative methodology not only enhances our understanding of the gut-brain axis but also opens new avenues for investigating the impact of environmental factors on human health. Additionally, it allows for the study of human-specific responses without

exposing individuals to potential risks. This combined in vitro model system represents a significant step forward in our ability to study the gut-brain axis and its response to various environmental factors, paving the way for new insights and therapeutic strategies.

4.2 Limits and perspectives

The gut-brain axis involves intricate communication between the gut microbiota, the enteric nervous system, the central nervous system, and the immune system. Replicating these multifaceted interactions in a controlled experimental setup is challenging.

While our study provides valuable insights into the interactions between GM and epithelial and endothelial cells, several limitations should be acknowledged. The in vitro nature of our experiments may not entirely capture the dynamic interactions and systemic influences present in vivo. The observed decrease in endothelial cell viability upon exposure to SHIME® supernatants highlights the need for further optimization of dilution ratios and experimental conditions. Future studies should explore more refined models that integrate multiple cell types and compartments to better mimic physiological conditions. Moreover, longitudinal studies assessing the long-term effects of SHIME® supernatants on cell viability and barrier integrity are warranted. Expanding our research to include analysis of a broader range of microbial communities and host cell types will enhance our understanding of the gut-brain axis and its implications for health and disease. Finally, to hypothetically improve our mechanistic approach and better mimic the gut-brain axis, we could explore the integration of more complex models.

Conclusion

Our study successfully combined the SHIME®, Caco-2, and BBB models to create a comprehensive in vitro system for studying the gut-brain axis. The stability of the SHIME model, along with the maintained viability, permeability, and tight junction integrity of the Caco-2 and BBB models, highlights the robustness of this integrated approach. This novel combination allows for a more ethical and human-relevant assessment of the effects of food contaminants on the gut-BBB axis, providing valuable insights without the need for animal models. This integrated system represents a significant advancement in our ability to study complex biological interactions and paves the way for future research in this field.

References

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37:13–25
- Abou Diwan M, Lahimer M, Bach V, et al (2023) Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota – Blood – Brain Barrier Axis : A Narrative Review
- Al-Sadi R, Youssef M, Rawat M, et al (2019) MMP-9-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 316:G278–G290. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00126.2018>

Cecchelli R, Aday S, Sevin E, et al (2014) A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099733>

Daneman R, Rescigno M (2009) Review The Gut Immune Barrier and the Blood-Brain Barrier : Are They So Different ? *Immunity* 31:722–735. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.012>

Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, et al (2023) Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med*. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>

Ding X, Hu X, Chen Y, et al (2021) Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. *Trends Food Sci Technol* 107:455–465. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.11.015>

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59:221–226. <https://doi.org/10.1093/JNCI/59.1.221>

Jagtiani E, Yeolekar M, Naik S, Patravale V (2022) In vitro blood brain barrier models: An overview. *J Control Release* 343:13–30. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.01.011>

Joly Condette C, Djekkoun N, Reygner J, et al (2022) Effect of daily co-exposure to inulin and chlorpyrifos on selected microbiota endpoints in the SHIME® model. *Environ Pollut* 302:118961. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.118961>

Menaceur C, Hachani J, Dib S, et al (2023) Highlighting In Vitro the Role of Brain-like Endothelial Cells on the Maturation and Metabolism of Brain Pericytes by SWATH Proteomics. *Cells* 12:1010. <https://doi.org/10.3390/CELLS12071010/S1>

Molly K, Vande Woestyne M, Verstraete W (1993) Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:254–258. <https://doi.org/10.1007/BF00228615>

Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK (2021) The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 19:241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>

Réquilé M, González Alvarez DO, Delanaud S, et al (2018) Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. *Environ Sci Pollut Res* 25:22529–22540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2332-4>

Reygner J, Condette CJ, Bruneau A, et al (2016) Changes in composition and function of human intestinal microbiota exposed to chlorpyrifos in oil as assessed by the SHIME® model. *Int J Environ Res Public Health* 13:. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111088>

Rizzi E, Deligne C, Dehouck L, et al (2021) A Triple Culture Cell System Modeling the Human Blood-Brain Barrier. *J Vis Exp* 2021:1–15. <https://doi.org/10.3791/63134>

Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweer S, et al (2020) Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells* 9:1–13. <https://doi.org/10.3390/cells9040851>

Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da Costa A, et al (2013) Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:334–339. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.07.004>

Sevin E, Dehouck L, Versele R, et al (2019) A Miniaturized Pump Out Method for Characterizing Molecule Interaction with ABC Transporters. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 5529 20:5529. <https://doi.org/10.3390/IJMS20225529>

Shimizu F, Sano Y, Abe M aki, et al (2011) Peripheral nerve pericytes modify the blood–nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 226:255–266. <https://doi.org/10.1002/JCP.22337>

Spadoni I, Pietrelli A, Pesole G, Rescigno M (2016) Gene expression profile of endothelial cells during perturbation of the gut vascular barrier. *Gut Microbes* 7:540–548. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1239681>

Šuligoj T, Vignæs LK, Van den Abbeele P, et al (2020) Effects of human milk oligosaccharides on the adult gut microbiota and barrier function. *Nutrients* 12:1–21. <https://doi.org/10.3390/nu12092808>

Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, et al (2015) The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Impact Food Bioact Heal Vitro Ex Vivo Model* 305–317. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_27

Versele R, Corsi M, Fuso A, et al (2020) Ketone bodies promote amyloid- β 1–40 clearance in a human in vitro blood–brain barrier model. *Int J Mol Sci* 21:1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21030934>

Versele R, Sevin E, Gosselet F, et al (2022) TNF- α and IL-1 β Modulate Blood-Brain Barrier Permeability and Decrease Amyloid- β Peptide Efflux in a Human Blood-Brain Barrier Model

Ethics declarations

Ethical approval

The study protocol received approval from the Ethical Committee for Non-Interventional Research (CERNI) at Picardy Jules Verne University (Evaluation number 2023-07-5/2023-27). The ethics committee of the Medical Faculty at the University of Yamaguchi Graduate School (IRB#: H18-033-6) approved the protocol for isolating pericytes from human tissue, ensuring adherence to the Declaration of Helsinki as revised in Somerset West in 1996. Additionally, the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH Number DC2011-1321) approved the protocol for isolating endothelial cells, and all related experiments were conducted in accordance with this approved protocol.

Consent to participate

Participation in this study was entirely voluntary, and participants could withdraw at any time without any penalty. Participants were given a detailed explanation of the study’s purpose, procedures, potential risks, and benefits. Confidentiality of the participants’ data was maintained throughout the study, since the protocol ensures that the processed data is anonymous. It does not allow for the identification of individuals, even indirectly, in any way; therefore, it is not considered personal data, and there is no correspondence table linking each person’s identity to a random number referring to a series of individual data.

Consent to publish

Not applicable.

Author Contributions

Conceptualization, P.C. and H.K-C; methodology, M.AD, J.P, S.D., E.S, P.C., H.K-C., S.D, E.S; software, M.AD, S.D. and E.S; validation, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; formal analysis, M.AD, J.P, S.D., E.S, P.C. and H.K-C; investigation, M.AD, J.P, E.S, P.C. and H.K-C; resources, F.G and V.B.; experiment, M.AD, J.P, A.H, S.D and E.S; data curation, M.AD, J.P, E.S and S.D; writing—original draft preparation, M.AD, J.P, A.H, E.S, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; writing—review and editing, M.AD, E.S, F.D, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; visualization, M.AD, J.P, E.S, H.O-A, P.C. and H.K-C; supervision, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; project administration, P.C. and H.K-C; funding acquisition, P.C. and H.K-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received funding from the French State and the Hauts-de-France Region as part of CPER MOSOPS 2021-2027 project. Maria Abou Diwan received a doctoral fellowship from the ‘Conseil régional du Nord-Pas-de-Calais’ (50%), Picardy University (25%), and the Artois University (25%).

Data availability Data is available on demand by email to the corresponding author.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

The authors would like to express their sincere gratitude to Dr. Arthur Foulon, gynecologist at the University Hospital of Amiens, for his invaluable assistance in identifying suitable participants and providing fecal samples. We are deeply appreciative of the women volunteers who participated in this study and donated their fecal samples for this research. Our thanks also go to the research management team at Picardy Jules Verne University for their support with the ethics approval application. Lastly, we extend our thanks to Professor Fumitaka Shimizu and Professor Takashi Kanda from the Department of Neurology and Clinical Neuroscience at Yamaguchi University in Japan for providing the human brain pericytes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Etude in vivo des effets du pesticide Chlorpyrifos et la prévention par l'inuline

A. Résumé

L'augmentation de la population mondiale a intensifié l'utilisation de pesticides pour satisfaire la demande alimentaire, posant des risques sanitaires significatifs, notamment en raison de l'exposition chronique aux résidus. En réponse, des réglementations ont été instaurées pour limiter l'usage de certains pesticides à haut risque, comme le DDT, interdit dans de nombreux pays. Cependant, des alternatives, telles que les organophosphorés et les carbamates, sont largement employées dans le secteur agricole. Parmi ces composés, le Chlorpyrifos (CPF), un organophosphoré couramment utilisé, présente des effets toxiques importants.

Le CPF agit principalement par inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase, essentielle à la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur clé dans la transmission de l'influx nerveux. Cette inhibition entraîne une accumulation d'acétylcholine dans les synapses, provoquant une surstimulation neuronale qui se traduit par des effets neurotoxiques, incluant un risque accru de stress oxydatif et d'inflammation via des voies de signalisation spécifiques. En raison de ses impacts sur le système nerveux central, le CPF suscite un intérêt croissant pour son potentiel effet néfaste sur la santé, notamment dans le contexte de l'axe intestin-cerveau, un réseau de communication entre le microbiote intestinal et le cerveau.

Des recherches récentes mettent en lumière la capacité du CPF à perturber le microbiote intestinal, une communauté de micro-organismes cruciale pour le maintien de la santé digestive, immunitaire et cognitive. En modifiant cet équilibre, le CPF peut induire une dysbiose intestinale, caractérisée par une diminution des bactéries bénéfiques et une prolifération de bactéries potentiellement pathogènes. Cette dysbiose peut affecter la barrière hémato-encéphalique, une structure qui protège le cerveau des substances toxiques. La perturbation de la BHE peut ainsi exposer le système nerveux central à des agents nocifs, augmentant les risques de troubles neurologiques et d'inflammation cérébrale. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels le CPF affecte le microbiote et la BHE demeurent peu compris, soulignant la nécessité d'études plus approfondies.

Dans ce contexte, les prébiotiques, tels que l'inuline, apparaissent comme des agents potentiels pour contrer les effets néfastes des pesticides sur le microbiote intestinal et la BHE. Les prébiotiques, des fibres alimentaires non digestibles, favorisent la croissance de bactéries bénéfiques, comme les *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, contribuant à un environnement intestinal équilibré. En tant que substrats pour ces bactéries, les prébiotiques restaurent l'homéostasie du microbiote, même après une

perturbation induite par des substances toxiques telles que le CPF. Ils produisent également des métabolites bénéfiques, notamment des acides gras à chaîne courte, qui renforcent les jonctions serrées de la BHE, limitant ainsi le passage de substances potentiellement nocives vers le cerveau.

Cette étude utilise un modèle animal pour évaluer les effets de l'exposition au CPF pendant la gestation et la lactation, avec une attention particulière aux réponses spécifiques au sexe. Nous explorons les effets conjoints du CPF et de l'inuline, un prébiotique reconnu, sur le microbiote intestinal et la BHE pendant la grossesse.

Seize femelles (rats) ont été réparties en quatre groupes : contrôle, exposé au CPF (1 mg/kg/jour par gavage), exposé à l'inuline (10 g/L d'eau), et co-exposé au CPF et à l'inuline de la pré-gestation jusqu'au sevrage. Des échantillons intestinaux, spléniques, hépatiques et de microvaisseaux cérébraux ont été analysés par des techniques microbiologiques et biomoléculaires. La culture bactérienne a permis d'évaluer la composition du microbiote intestinal (bactéries viables et cultivables) et leur translocation vers des organes distaux. Les techniques de RT-qPCR et de Western blot ont mesuré l'expression des gènes et les niveaux de protéines des jonctions serrées (JS) dans les microvaisseaux cérébraux.

Les résultats montrent que le CPF induit une dysbiose intestinale marquée par une diminution des bactéries bénéfiques et une augmentation des bactéries potentiellement pathogènes, compromettant l'intégrité de la BHE et exposant potentiellement le cerveau à des substances toxiques. En revanche, l'inuline favorise la croissance de bactéries bénéfiques et réduit la translocation bactérienne. L'exposition au CPF a entraîné une dysbiose intestinale chez les descendants, avec une diminution des *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et une augmentation de *Escherichia coli*, entraînant une translocation bactérienne vers la rate et le foie. Le CPF a également diminué les niveaux d'expression des protéines de JS (diminution de 50 à 60 % de CLDN3, $p < 0,05$). L'inuline a, en revanche, atténué ces effets néfastes et restauré l'expression de ces gènes à des niveaux proches du contrôle. Nos résultats démontrent un lien causal entre les altérations du microbiote intestinal et les perturbations de l'intégrité de la BHE.

En conclusion, notre étude met en évidence le potentiel protecteur de l'inuline contre la dysbiose induite par le CPF et son rôle dans le maintien de l'intégrité de la BHE, ouvrant la voie à des stratégies thérapeutiques pour atténuer les effets neurotoxiques des pesticides, en particulier chez les descendants exposés pendant la période périnatale.

B. Article de l'étude in vivo

Article publié, le 26 septembre 2024, dans le journal

Environmental Science and Pollution Research (IF: 5.1)

Maternal exposure to pesticides induces perturbations in the gut microbiota and blood – brain barrier of dams and the progeny, prevented by a prebiotic

Maria Abou Diwan^{1,2}, Narimane Djekkoun¹, Marie-Christine Boucau², Aurélie corona¹, Lucie Dehouck², Maurice Biendo¹, Fabien Gosselet², Véronique Bach¹, Pietra Candela^{2,†} and Hafida Khorsi-Cauet^{1,*,†}

¹ PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01 UPJV/INERIS, Centre Universitaire de Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens, France

² Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300 Lens, France

*Correspondence: hafida.khorsi@u-picardie.fr

† These authors contributed equally to this work.



Maternal exposure to pesticides induces perturbations in the gut microbiota and blood–brain barrier of dams and the progeny, prevented by a prebiotic

Maria Abou Diwan^{1,2} · Narimane Djekkoun¹ · Marie-Christine Boucau² · Aurélie Corona¹ · Lucie Dehouck² · Maurice Biendo¹ · Fabien Gosselet² · Véronique Bach¹ · Pietra Candela² · Hafida Khorsi-Cauet¹

Received: 9 July 2024 / Accepted: 9 September 2024
© The Author(s) 2024

Abstract

Exposure to pesticide residues during the first 1000 days of life can disrupt body homeostasis and contribute to chronic metabolic diseases. Perinatal chlorpyrifos (CPF) exposure alters gut microbiota (GM) balance, potentially affecting offspring's health. Given the GM influence on brain function, the primary aim is to determine if pesticide-induced dysbiosis (microbial imbalance) affects indirectly other organs, such as the blood–brain barrier (BBB). The secondary objective is to evaluate the prebiotics protective effects, particularly inulin in promoting microbial balance (symbiosis), in both mothers and offspring. A total of 15 or more female rats were divided in 4 groups: control, oral CPF-exposed (1 mg/kg/day), exposed to inulin (10 g/L), and co-exposed to CPF and inulin from pre-gestation until weaning of pups. Samples from intestines, spleen, liver, and brain microvessels underwent microbiological and biomolecular analyses. Bacterial culture assessed GM composition of living bacteria and their translocation to non-intestinal organs. RT qPCR and Western blotting detected gene expression and protein levels of tight junction markers in brain microvessels. CPF exposure caused gut dysbiosis in offspring, with decreased *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and increased *Escherichia coli* ($p < 0.01$) leading to bacterial translocation to the spleen and liver. CPF also decreased tight junction's gene expression levels (50 to 60% decrease of CLDN3, $p < 0.05$). In contrast, inulin partially mitigated these adverse effects and restored gene expression to control levels. Our findings demonstrate a causal link between GM alterations and BBB integrity disruptions. The protective effects of inulin suggest potential therapeutic strategies to counteract pesticide-induced dysbiosis.

Keywords Gut-microbiota-BBB axis · Pesticides · Chlorpyrifos · Prebiotics · Perinatal period · Rat model · Dysbiosis · Bacterial translocation

Highlights

- First in vivo study examining Chlorpyrifos (CPF) and inulin's combined effects on the blood–brain barrier (BBB)
- Use of a rat model to mimic perinatal exposure effects on gut microbiota (GM) and BBB
- Analysis of sex-specific responses to indirect CPF-exposure in

offspring

- Inulin mitigates CPF-induced gut dysbiosis and bacterial translocation to sterile organs
- CPF reduces tight junction gene expression in brain microvessels, partially restored by inulin
- Findings suggest inulin as a potential preventive strategy against pesticide-induced GM dysbiosis

Responsible Editor: Lotfi Aleya

Pietra Candela and Hafida Khorsi-Cauet contributed equally to this work.

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

The rising global population has increased food demand, leading to widespread pesticide use, which poses significant health concerns, particularly through chronic oral exposure (Mostafalou and Abdollahi 2016). This has led to restrictions of pesticide use and the prohibition of some substances, like dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) and the shift to lower-risk alternatives: organophosphates and carbamates (Abubakar et al. 2019). Organophosphates, acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, have been used in large quantities for many years which led to accumulation in soils and water despite having a half-life of less than 200 days (Supreeth and Raju 2017). Chlorpyrifos (CPF), a widely used organophosphate insecticide, is known to exert its toxic effects primarily by inhibiting AChE, a pivotal enzyme in nerve impulse

 Springer

transmission (Darwiche et al. 2018; El Khayat El Sabbouri et al. 2020). The irreversible inhibition of AChE is due to metabolic activation of CPF to CPF-oxon. This leads to the accumulation of acetylcholine (ACh) at synapses and neuromuscular junctions, resulting in overstimulation of the nervous system, causing neurotoxicity, oxidative stress, and inflammation through the PI3K/AKT/JNK pathway (Zhang et al. 2023).

The nervous system is not the only target of CPF toxicity. Recent studies have shown that CPF exposure may disrupt body homeostasis by affecting the gut microbiota (GM) and the blood–brain barrier (BBB), although the exact mechanisms remain unclear (Li and Ehrich 2013; Joly Condet et al. 2015; Balaguer-Trias et al. 2022; Abou Diwan et al. 2023). Bidirectional communication exists between GM and BBB and is part of the endocrine network in the gut-microbiota-brain axis. However, the causal relationship between CPF exposure, changes in GM, and alteration of the BBB has not been elucidated.

GM is a major gut component and a critical regulator of food contaminants and body homeostasis. This complex community of microorganisms, primarily bacteria of two major phyla *Bacillota* and *Bacteroidota*, is implicated in many physiological functions including absorption, metabolism, the endocrine system, and immunity (Valdes Ana et al. 2018; Matsuzaki et al. 2023).

In pregnant dams, CPF exposure has been associated with an imbalance in the intestinal flora known as intestinal dysbiosis characterized by a decrease in the potentially beneficial flora and an increase in the potentially pathogenic flora (Jin et al. 2016; Djekkoun et al. 2022a, b). This imbalance can be countered by inulin, a prebiotic that promotes the growth of beneficial bacteria like *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* and prevents intestinal dysbiosis and bacterial translocation (the passage of bacteria across the intestinal barrier (IB) (Reygner et al. 2016; Réquillé et al. 2018). In fact, prebiotics are emerging as one of the most frequently used substances to maintain a healthy microbiome or restore its balance when bacterial equilibrium is disrupted (Uerlings et al. 2020). As a soluble dietary fiber found in many plant species such as chicory and artichoke, inulin is fermented by the beneficial bacteria (*Bifidobacterium* and *Lactobacillus*) of the GM to beneficial metabolites including short-chain fatty acids (SCFAs) (Wang et al. 2023). It is now a well-known prebiotic with an outstanding beneficial regulation of intestinal microbiota and is well-tolerated up to 10 g/day in healthy young adults (Bonnema et al. 2010; Holscher et al. 2014). However, the consequences of intestinal microbiota modulations by dietary fibers on BBB and the alleviation of pesticide effects by prebiotics have not been well documented.

In numerous investigations, the GM has been scrutinized as an

autonomous entity, largely neglecting the implications of pesticide-triggered intestinal dysbiosis on the BBB.

Given the interconnectedness of the gut-brain axis, investigating inulin's effects on the GM, and BBB is crucial. CPF-induced gut dysbiosis may compromise the BBB, a vital barrier that protects the brain, potentially leading to neurological disorders. The integrity of the BBB relies on tight junctions, and their disruption could permit harmful substances to enter the brain, causing central nervous system (CNS) damage. The long-term effects of such disruptions, especially in offspring, are not well understood (Li and Ehrich [2013](#); Lee et al. [2018](#); Réquillé et al. [2018](#); Cresto et al. [2023](#)).

While most research has focused on the effects of CPF alone, our study uniquely explores the combined impact of CPF and inulin on GM and BBB during pregnancy. Notably, this is the first *in vivo* study to address the effect of CPF and inulin on the BBB, highlighting the novelty of our work. By examining inulin's protective role against CPF-induced dysbiosis and its influence on BBB integrity, this research makes a significant contribution to the field. Using a rat model to mimic the perinatal period *in vivo*, we assessed how pesticide exposure during gestation and lactation affects GM and BBB integrity in both mothers and offspring. Our analyses had a specific focus on sex-specific responses, as differences in CPF exposure effects between males and females have been documented (Shaffo et al. [2018](#); Guardia-Escote et al. [2018](#)).

old, body weight (BW) 225 ± 4.9 g) were randomly assigned to different experimental conditions ($n = 4/\text{group}$). For the

Materials and methods

Animals and study design

Animal housing

Wistar rats (Janvier laboratory—Saint Berthevin, France) were housed in pairs under stable environmental conditions, with an ambient temperature 23 ± 1 °C, a relative humidity of 26% and a 12-h light/dark cycle).

Daily animals' welfare monitoring and experiment protocol approval were previously detailed in our studies (Guibourdenche et al. [2021](#); Djekkoun et al. [2022a](#); Lahimer et al. [2023](#)). The experiment protocol was approved by the local ethic committee (C2EA-96), the Regional Directorate for Health, Animal Protection, and the Environment in Amiens, France, as well as the Ministry of Research (reference number APAFIS #8207–2016121322563594 v2, approved on September 5, 2017). All animals were treated in compliance with EU Directive 2010/63.

Experimental design

Following a 1-week acclimation period, 16 mothers (7-week-

reproduction protocol, each group was configured to include four females. This setup was designed to ensure a minimum of 6 to 10 female/male offspring for the analysis of passive impacts. Females were divided into 4 groups: C (control, standard chow (SC) diet, Serlab, Montataire, France), CPF (Chlorpyrifos), CPFI (CPF + inulin) and I (inulin). CPF females received 1 mg/kg of BW/day of CPF (O, O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate solution (purity 99.8% $\pm$ 0.1%, supplied by LGC Standards Laboratory, Molsheim, France). Dissolved in organic rapeseed oil, CPF was orally administered to the animals on a daily basis for 5 consecutive days, followed by a 2-day break, using gavage. 1 mg/kg BW represents the “no observed adverse effect level” (NOAEL) for the inhibition of cerebral cholinesterase activity in rats within the CPF groups. The remaining two groups were subjected to the mentioned diet and supplemented with prebiotics: 10 g/L inulin in water. The mean intake of inulin was 3.73 mg $\pm$ 0.04 mg/g of BW/day (Djek-koun et al. 2022a) (estimated based on the volume of water consumed daily, as dams were housed individually from pregnancy until lactation). The 16 female dams were mated and upon pregnancy confirmation, housed individually, and exposed until the end of lactation. They were divided into 4 groups based on maternal exposure: CTRL group (standard chow), CPF

group (standard chow + CPF), inulin (standard chow + inulin), CPF-inulin (standard chow + CPF and inulin). The day of birth was marked as post-natal day 1 (PND1). Each litter averaged 10 pups, with 54% males. Offspring were monitored from birth until their early adult stage (60 days). They were not given any treatment and had unrestricted access to standard food and water. Animals were sacrificed at PND60 (young adults). Animals were fasted, the night before sacrifice and euthanized using intraperitoneal sodium pentobarbital (EXAGON 140 mg/kg–0.35 mL/kg) (Axience SAS, Pantin, France). Brain samples, intestinal segments, and other organs (liver, spleen, AND adipose tissue) were collected under sterile conditions and stored at -80°C (Fig. 1).

Microbiological analysis

Bacterial composition of intestinal microbiota and bacterial translocation

As described in Djekkoun et al. (2022b, a), the organs were measured in weight, placed within a sterile stomacher bag, and then blended using Ringer’s saline solution (Bio-Rad, Marne la Coquette, France). Subsequently, serial dilutions were prepared by a factor of ten. Following this, 1 mL of the homogenized intestinal segments and sterile organs was

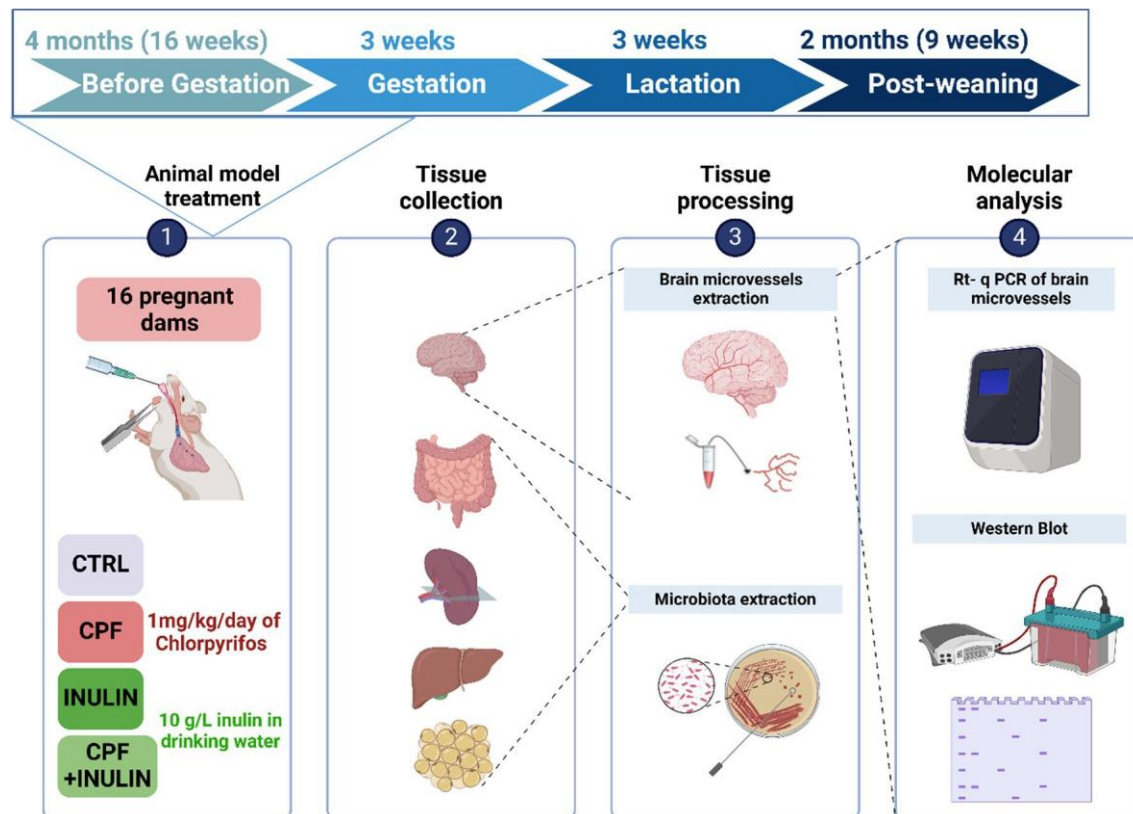


Fig. 1 Experimental study design

evenly distributed onto various selective and non-selective media to determine the presence of aerobic and anaerobic microbiota qualitatively and quantitatively (Bactron Anaerobic, Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR, USA). The cultures were incubated at 37 °C for a period ranging between 48 h and 4 days, and bacterial identification was performed using established microbiological methods. The isolated colonies on the Petri dishes were enumerated using an automated system (Scan® 500, Inter-science, St Nom la Bretèche, France) and expressed as log (colony forming unit CFU)/g of tissue.

Bacterial fermentation metabolites

SCFAs (acetate, butyrate and propionate) were analyzed by gas chromatography in diluted gut microbiota samples and quantified by comparison to a standard curve (Djekoun et al. 2022a).

Microvessel isolation from rats' brain (BBB)

Cortices

The protocol for isolating microvessels from rat's brain protocol was adapted from a previously detailed study of our laboratory colleagues (Coisne et al. 2005). Cortices were isolated, excluding the striatum, brain white matter, cerebellum, and optic nerves. The outer vessels and meninges were carefully removed. The tissue was homogenized in HBSS 1 × with 10 mM HEPES and 0.1% BSA. The homogenate was combined with 30% dextran in HBSS 1 ×, with 10 mM

HEPES and 0.1% BSA and centrifuged at 3000 g for 25 min (min) at 4 °C. The resulting pellet, containing microvessels, was further purified by repeated centrifugation. The vascular fraction was dissociated and filtered through a 59-µm nylon mesh to separate large vessels from capillaries. The enriched capillaries fraction was filtered through a 5-µm nylon mesh and suspended in ice-cold HBSS 1 × with 10 mM HEPES and 0.1% BSA. The filtrate was divided into equal volumes and centrifuged at 1000 g for 7 min at 4 °C. The resulting pellets were used for RNA and protein extractions, with NucleoZOL (lysis buffer of Macherey–Nagel NucleoSpin RNA extraction set for NucleoZOL) and RIPA 1 × lysis buffer (Merck Millipore, USA) added, respectively. The lysates were homogenized and frozen at – 80 °C until further extractions.

mRNA extraction and RT-PCR

Microvessel mRNA extraction was then performed using the commercially available Macherey–Nagel NucleoSpin® RNA extraction set for NucleoZOL. The RNA quantity and purity were assessed using a spectrophotometer, measuring absorbance at A260 and A280 nm. Reverse transcription (RT) was conducted in a total volume of 20 µL, comprising 250 ng of RNA, RT-MIX (BioRad iScript™ Reverse Transcription Supermix), and RNase-free water. RT and qPCR amplifications method we adopted were previously detailed (Versele et al. 2022). GAPDH and ubiquitin were used as housekeeping genes to normalize mRNA. Primers of housekeeping genes and targets are listed in Table 1 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Table 1 q-PCR primer pair nucleotide sequences (*Rattus norvegicus*), forward (F) and reverse (R) 5' to 3' primer sequence (accession numbers of cDNA from NCBI database)

Role	Gene	Sequences (5'-3')	Accession number
Housekeeping genes	GAPDH	F: AAGGTCGGTGTGAACGGATT R: CTTTGTCAAGAGAAGGCAGC	NM_017008.4
	Ubiquitin	F: CACCAAGAAGGTCAAACAGGAA R: TCAAACCAAGAACAAGCACAA	NM_017314.1
Tight junction proteins	Occludin	F: TGACTACAGAGAGGAGAGCGAA R: CTGCAGATCCCTTAAGTGTCT	NM_031329.2
	Claudin 3	F: CCAACACCATCATCCGGGATT R: GTACAACCCAGTTCCCATCTCT	NM_031700.2
	Claudin 5	F: CTGGTTCGCCAACATCGTAG R: CCAGCTCGTACTTCTGAGACA	NM_031701.2
	ZO-1 (associated to TJ)	F: CTCTCAACAGAAAGCAGAAGCC R: TGCTTAAGTGCAGAGGCTGA	NM_001106266.1
Adhesion molecules	ICAM-1	F: AGACCACTGTGCTTTGAGAACT R: GCTCTGGGAACGAATACACAGT	NM_012967.1
	VCAM-1	F: ACACAGCAGTCAAATGGAGTCT R: GGTGGGTTCTTTCGGAGCAA	NM_012889.2
Inflammation markers	NLRP3	F: ACCACAGTGTAACTTGAGAGAA R: GTAGGTACAGGTGTGTGAGGTT	NM_001191642.1
	TLR4	F: ATTGTTCTTTCTCCTGCCTGAGA R: TCTGATCCATGCATTGGTAGGT	NM_019178.2

Endothelial cells, neuronal, and pericyte markers were used to verify the purity of our endothelial cells microvessel-enriched fraction.

Protein assay and western blot

Protein lysates were thawed on ice and centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 10 min to eliminate cellular debris. The protein assay of supernatant was performed using Bradford method (BioRad, France), at 595 nm (spectrophotometer Synergy H1, BioTek, France).

Samples with 20 µg of protein were prepared in Laemmli buffer (BioRad, Munich, Germany) with beta-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Germany) and then heated at 95 °C for 5 min and electrophoresed using precast Criterion™ TGX™ gels (Bio-rad). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Germany), blocked with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween (TBST) 20 and 5% skimmed milk and incubated with primary antibodies (Table 2) overnight at 4 °C, except for β-actin (20 min at room temperature). After washing with TBST, membranes were incubated with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (Table 3). Protein bands were visualized using enhanced chemiluminescence reagent (GE Healthcare) and imaged with the Azure c600 Western blot Imaging system (Azure Biosystems, Dublin, Ireland). Band densities were quantified using AzureSpot 2.0 Gel Analysis software (Azure Biosystems, Dublin, Ireland), normalized to β-actin.

Statistical analysis

The bacterial composition data were expressed as mean ± standard deviation, unless otherwise specified. SPSS (version 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) and Stat View software (version 5.0, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA) were used to conduct statistical analyses. Both one-way and two-way analyses of variance (ANOVA), as well as a chi-squared test, were employed (Djekkoun et al. 2022a). The statistical significance threshold was set at $p < 0.05$ for all analyses. Although for female dams we were limited to 4 groups of 4 dams, we had 7 to 10 pups in each offspring group. The gut microbiota results we showed were those of male offspring

Table 3 Secondary antibodies used for the western blot experiment

Secondary antibodies	Dilution	Reference
Goat anti-rabbit HRP	1:8000	Dako PO44801
Goat anti-mouse HRP	1:5000	Dako PO44701

that were analyzed statistically with $n > 6$. In parallel, for the results illustrating the effects on BBB in offspring, we also had 7 to 10 brains per group and for each microvessel extraction (4 to 5 extractions/group), we needed to pool two brains coming from the same groups to: (1) have enough material for RT-qPCR and western blot analysis, (2) ensure the minimum number allowing statistical analysis, and (3) respect the number of rats allowed in the study based on ethical and animal protection.

The data of RT-qPCR analysis were presented as the average ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 8.0.1 statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Data from the RT-qPCR experiments were assessed employing a two-way ANOVA method when $n = 7$ to 10 (Guibourdenche et al. 2021). However, for dams' results, when having $n < 6$, we used a non-parametric test (Kruskal–Wallis test) (Deepika et al. 2022). $p < 0.05$ was set as the criterion for determining statistical significance for all analyses.

Results

Bacterial composition of intestinal microbiota

Pesticide exposure can elicit gender-specific responses (Comfort and Re 2017; Gao et al. 2017). In our previous published work, we illustrated results regarding the effect of CPF exposure on dams and female offspring bacterial composition of intestinal microbiota. Here, our attention is directed towards the microbial composition of male offspring. Starting with the analysis of total flora, no significant difference was observed between the male offspring groups (aerobic flora $p = 0.174$, anaerobic flora $p = 0.978$ CPF vs. control). Afterwards, our assessment of the microbial composition at the phylum level revealed modification of concentrations of selected gut bacteria in male offspring.

Table 2 Primary antibodies used for the western blot experiment

Primary antibodies	Size (kDa)	Dilution	Reference
Rabbit anti-Occludin	59	1:1000	ab-216327
Rabbit anti-Claudin 5	23	1:1000	GTX49370
Mouse anti-β-actin	42	1:20000	A5441B (Sigma)
Mouse anti-ICAM-1	56	1:250	MA5407 (Invitrogen)
Rabbit anti-VCAM-1 CD106	110	1:1000	PA5-80,213 (Invitrogen)

We observed a significant decrease of *Lactobacillus* spp. concentrations in male offspring treated with CPF compared to the control group ($p < 0.001$) (Fig. 2A). *Bifidobacterium* spp. results revealed a significant decrease ($p < 0.001$ vs. control group). On the contrary, we observed a significant increase, compared to the control group, in the potentially pathogenic flora within the CPF-treated males: *Escherichia coli* ($p < 0.01$), *Enterococcus* ($p < 0.001$) and *Staphylococcus* ($p < 0.001$) (Fig. 2B). Interestingly, prebiotic increased the concentration of *Lactobacillus* spp. ($p < 0.01$ vs. CPF) and *Bifidobacterium* spp. ($p < 0.001$ vs. CPF) respectively (Fig. 2A). However, we did not find a significant effect of inulin treatment on the potentially pathogenic flora compared to CPF group. These results altogether showed that CPF treatment significantly modulated both potentially beneficial and pathogenic GM populations leading to a bacterial dysbiosis in male offspring, whereas inulin beneficial effects targeted the potentially beneficial bacteria only.

In parallel to bacterial composition, we analyzed the SCFAs profile which varied based on the treatment. CPF increased the acetic acid content by 2% in the dams, though

this increase was not significant. In the offspring, the acetate ratio significantly increased by CPF exposure but inulin prevented it ($p = 0.012$; CPF = 71.3%, CPF-inulin = 53.7%). Regarding propionate and butyrate levels in both dams and offspring, there were increases but these variations were not significant in dams for either metabolite. In the offspring, CPF decreased propionic acid concentrations that were partially restored by inulin supplementation (CPF-inulin = 15.3% vs. C = 15.4% vs. CPF = 12.6%). Notably, in the offspring, the inhibition of butyrate by CPF and its recovery by inulin was significant ($p = 0.008$; CPF-inulin = 27.4% vs. CPF = 16.0%).

BT

To check if bacterial dysbiosis led to bacterial translocation (BT) of intestinal bacteria to sterile organs across the IB, we used bacterial culture methods to detect the translocation of bacteria that crossed the barrier towards spleen, liver, mesenteric adipose tissue, and gonadic adipose tissue (only data of spleen and liver are shown). To understand the factors affecting the translocation risk, we assessed the potential relationship

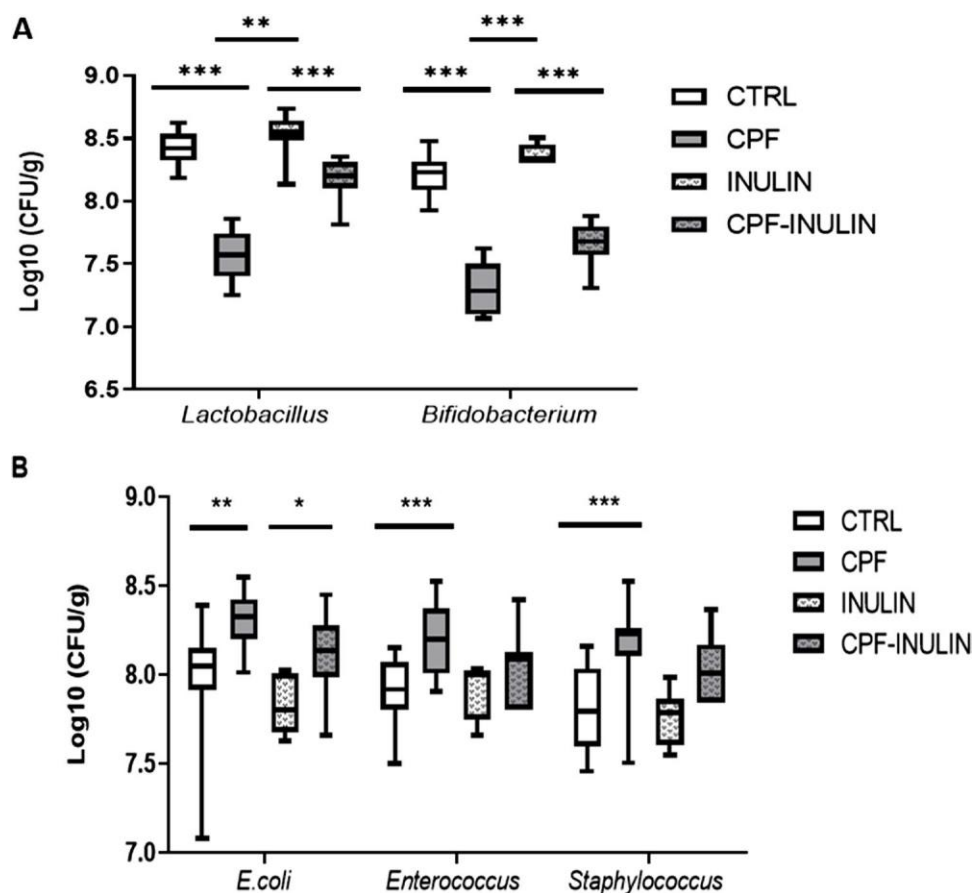


Fig. 2 Effects of chronic exposure to CPF and inulin on gut microbiota beneficial bacteria (A) and potentially pathogenic bacteria (B) in male offspring. Data is illustrated as mean $\pm$ standard deviation

($n = 7-10$) using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CTRL, control; CPF, chlorpyrifos; inulin; CPF-inulin, chlorpyrifos + inulin

between organ type, sex, treatment group, and translocation risk in the F0 (rat dams) and F1 (offspring) generations using logistic regression models performed with R® software version R-4.3.3 and Excel® software version 2010. A logistic regression model was initially used to assess the impact of organ type, gender, generation, and treatment group assignment on translocation risk. Then, the model was extended by including all variables together to explore potential confounding effects and to identify independent associations with translocation risk.

Influence of exposure on BT

In our analysis, we observed varying effects of exposure to CPF, inulin, and CPF-inulin on translocation risk with the reference group as the control category. Our results showed a large aerobic bacterial translocation to the spleen in CPF groups (25% of dams, 25% of female offspring, and 29.4% of male offspring) compared to control groups (0%) (Table 4). Overall, the CPF group had a significantly higher risk of translocation ($p < 0.001$) compared to the control group. No translocation to spleen is observed in dams and female offspring inulin groups (0%), while 14.28% of translocation is shown in male offspring inulin group compared to control (Table 4). The inulin group did not show a significant effect on translocation risk ($p = 0.6946$, inulin vs. control group). This statistical result confirms that inulin does not induce bacterial translocation contrarily to CPF pesticide. Similarly, in CPF + inulin groups, no translocation occurred except for the 20% observed in the male offspring group vs. control. In fact, the CPF-inulin group showed a less significant positive effect on translocation risk than CPF ($p = 0.0509$). Interestingly, when we compared our results to the reference category CPF, the logistic regression model showed that the CPF-inulin and inulin groups had a negative impact on translocation risk ($p < 0.001$). This suggests that being part of these groups is associated with a reduced risk of translocation compared to the CPF group. These findings

show that CPF-inulin and inulin provide significant protection against translocation compared to the CPF group.

Influence of organ on BT

Compared to results in the spleen, higher levels of bacterial translocation were detected in liver of CPF groups of dams (75%) and female offspring (62.5%) but only 17.6% in the male offspring group, compared to all control and inulin groups (0%) (Table 4). Nevertheless, the logistic regression model provided no significant association between organ type and the occurrence of translocation ($p = 0.139$).

Influence of gender on BT

When analyzing results by gender, we noticed that dams and their female offspring shared similar translocation profile in the different exposure groups (the influence of gender is significant for CPF groups) in spleen, liver, and gonadic adipose tissue but not in mesenteric adipose tissue where female offspring shared similar results with male offspring. It seems that inulin reduced bacterial translocation in females more than in males. This led us to the hypothesis that CPF and inulin effects on translocation risk differ between female and male. Based on the provided logistic regression model, we did not find significant difference in translocation risk between male and female progeny ($p = 0.568$), but we did find that the interaction between sex and organ had a significant effect on translocation in individuals of the progeny ($p = 0.0160$). These findings highlight the importance of taking sex into account when assessing the effect of organs on translocation. They also indicate that gender modifies the relationship between organs and translocation, which could have significant implications for understanding the mechanisms underlying translocation.

Influence of generation on BT

Our overall descriptive comparison of results in dams to those of offspring showed differences only in the mesenteric adipose tissue where we observed similar translocation percentage in the different exposed groups between female and male offspring, but they were different from their mother translocation profile (data not shown for mesenteric adipose tissue). The logistic regression model provided no significant association between generations and the occurrence of translocation ($p = 0.8507$).

Gene expression analysis of tight junctions of microvessels (BBB)

Dams

Considering the crucial importance of maintaining the integrity of the BBB for proper brain functionality, predominantly

Table 4 Percentage of animals ($n = 3-10$) with bacterial translocation to sterile organs, for dams, female, and male offspring. The data are expressed as a percentage ($n = 3-10$)

Treatment	Organ	Female dams	Female offspring	Male offspring
Control (Ctrl)	Spleen	0	0	0
CPF		25	25	29.4
Inulin		0	0	14.28
CPF + inulin		0	0	20
Control (Ctrl)	Liver	0	0	0
CPF		75	62.5	17.6
Inulin		0	0	0
CPF + inulin		25	16.6	10

attributed to the tight junctional complex, we proceeded to analyze the tight junctions within microvessels following pesticide treatment. This analysis aimed to assess the integrity of the BBB in dams. In pursuit of this objective, real-time qPCR experiment was employed to assess the impact of CPF and inulin on the expression of the key tight junctions' proteins constituting the BBB. As shown in Fig. 3, our results demonstrate a significant reduction in mRNA levels following CPF exposure. Specifically, CLDN3 exhibited a 50% decrease; CLDN5 decreased by 70%, occludin by 60%, and ZO-1 by 40% ($p < 0.05$). Compared to CPF alone, inulin supplementation (CPF + inulin) tended to increase the expression of CLDN5 and OCLN but not for CLDN3 and ZO-1. These findings underscore the detrimental impact of CPF exposure on the integrity of BBB tight junctions, highlighting potential mechanisms underlying neurotoxicity associated with pesticide exposure.

Progeny

RT qPCR results

Previous studies have suggested that exposure to CPF may exert effects on offspring. These potential effects encompass microbiota abnormalities, alterations in endocrine disruptions, and reproductive issues. This study examines the impact of CPF exposure on tight junction proteins in brain microvessels of progeny rats. Following rat sacrifice, brain microvessels were extracted and the mRNA levels of tight junction proteins were analyzed. Our findings illustrated in Fig. 4(A and B) demonstrate significant alterations in female progeny rats exposed to CPF. Specifically, CPF exposure led to a substantial increase in CLDN5 mRNA levels (210%, $p < 0.001$) and OCLN mRNA levels (195%, $p < 0.05$)

compared to control groups (Fig. 4A). No significant change was observed for ZO-1. Similarly to the female progeny, our study revealed significant alterations in tight junction mRNA levels in male offspring (Fig. 4C and D). Specifically, CPF exposure led to a notable decrease in CLDN3 mRNA levels to 39% ($p < 0.05$) (Fig. 4C). Supplementation with inulin alone resulted in an 80% decrease ($p < 0.01$) in CLDN3 mRNA levels, while the combination of CPF and inulin led to a 64% decrease ($p < 0.05$). No significant variations were observed in the mRNA levels of CLDN5 and ZO-1. Furthermore, analysis of OCLN gene expression demonstrated a significant increase of 65% ($p < 0.05$) following exposure to CPF in combination with inulin compared to inulin alone. However, this increase was not significant compared to control or exposure to CPF alone. In addition, for female progeny, we explored the impact of CPF exposure on efflux pumps (glycoprotein P and breast cancer resistant protein BCRP) and pro-inflammatory markers (intercellular adhesion molecule ICAM-1, vascular cell adhesion molecule VCAM-1, Toll-like receptor TLR4, and NLR family pyrin domain containing NLRP3). Here, we detailed our results concerning pro-inflammatory markers (Fig. 4B). Our findings revealed a significant increase of 120% in ICAM-1 gene expression following CPF exposure compared to control groups. Interestingly, inulin supplementation led to a notable decrease in ICAM-1 expression to 35% compared to CPF alone ($p < 0.05$), suggesting a mitigating effect on inflammation by inulin. Additionally, we observed a significant increase in NLRP3 mRNA levels by CPF alone (241%) compared to control, which was attenuated to 170% by inulin supplementation (CPF + inulin) ($p < 0.01$). However, no significant variations were detected in VCAM-1 and TLR4 gene expression.

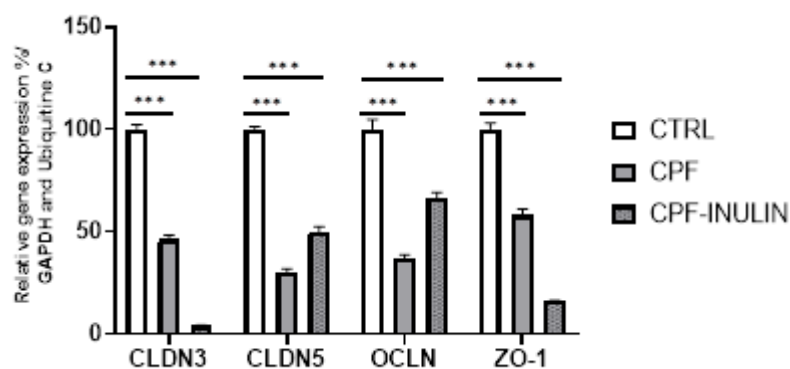


Fig. 3 Effects of chronic oral exposure to CPF and inulin on BBB tight junctions in dams. Values are expressed as mean $\pm$ SEM using the non-parametric Kruskal–Wallis test. Significance * $p < 0.05$; **

$p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CTRL, control; CPF, chlorpyrifos; inulin; CPF-inulin, chlorpyrifos + inulin

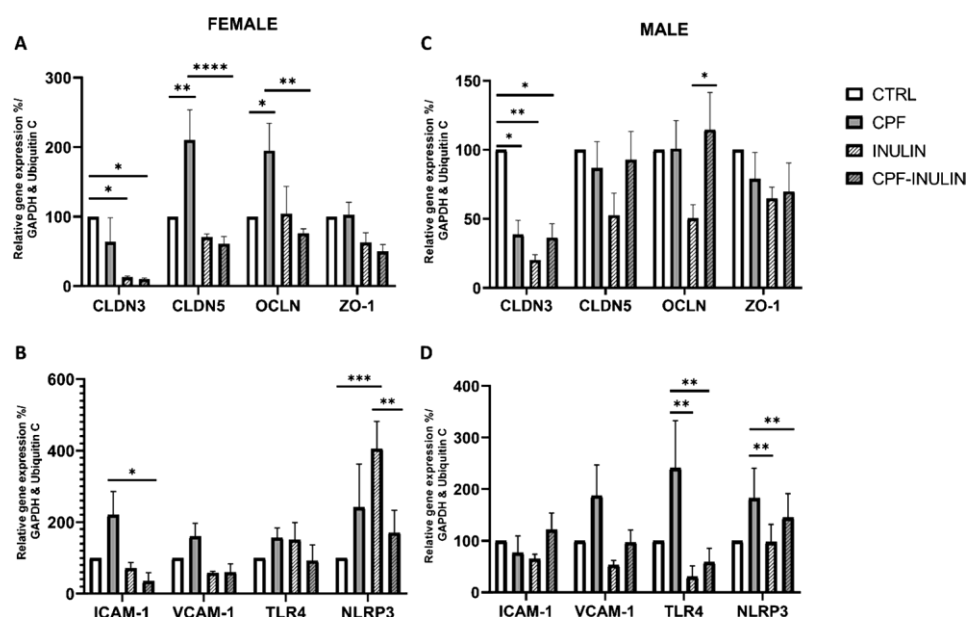


Fig. 4 Effects of chronic exposure to CPF and inulin on BBB tight junction's mRNA levels in female and male progenies. Values are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=7-10$) using analysis of variance

(two-way ANOVA–Tukey multiple comparisons test). Significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CTRL, control; CPF, chlorpyrifos; inulin; CPF-inulin, chlorpyrifos + inulin

In parallel, our analysis of male progeny revealed significant findings regarding the expression of TLR4 and NLRP3 in response to different experimental conditions (Fig. 4D). Specifically, we observed a significant decrease in TLR4 expression in the inulin and CPF + inulin groups compared to the CPF alone exposed groups ($p < 0.01$). Additionally, our study demonstrated an increase in NLRP3 mRNA levels induced by CPF alone (182%) compared to control ($p < 0.01$). However, this increase was mitigated to 144% by inulin supplementation (CPF + inulin) ($p < 0.01$). These findings underscore the potential of inulin supplementation in modulating the expression of inflammatory markers in male progeny exposed to CPF.

Protein assay and western blot

After the analysis of the impact of CPF exposure on mRNA levels of tight junction proteins and pro-inflammatory markers in brain microvessels of rat progeny, we quantified the corresponding protein levels using western blot analysis. Our findings illustrated in Fig. 5 reveal alterations of cln5, ocln, and ICAM-1 protein levels in both female and male progeny rats. Specifically, CPF exposure resulted in a significant increase in cln5 protein levels (588.99%, $p < 0.05$) and ocln protein levels (206.93%, ns) compared to control groups in female rats. Conversely, inulin supplementation decreased cln5 protein expression to levels similar to those of control group (133.36%, $p < 0.05$ CPF-inulin vs. CPF) in female offspring. Similarly, both inulin alone and inulin supplementation (CPF-inulin) restored occludin protein levels to those observed in the control group (CPF 120.62%, CPF-inulin 126.27% vs. control, non-significant).

In contrast to the observations in female offspring, we did not detect significant variations in the protein levels of cln5 and occludin in male offspring. As a result, our statistical analysis indicated a discernible difference in the expression variation pattern of cln5 between male and female rats ($p = 0.088 < 0.1$ (indicative) male vs. female). In addition, we explored the impact of CPF exposure on adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1). In Fig. 5, we illustrate results of ICAM-1 protein levels. We found no significant variations in ICAM-1 protein levels. However, the comparison of expression variation pattern of ICAM-1 between male and female revealed a significant difference ($p < 0.05$).

These results showed that CPF altered tight junctions' protein levels especially, while inulin restored their expression to control levels in female progeny and maintained stable protein levels relatively to control in male progeny. The treatment-related variation patterns of claudin 5 and occludin protein expression closely paralleled the variation observed in mRNA levels in both male and female progeny. These findings suggest a congruence between our western blot results and those obtained from RT-qPCR analysis.

Discussion

Involved in many physiological functions, the gut microbiota stability is considered the key to the health of distant organs (Vernocchi et al. 2016; Appleton 2018; Valdes Ana et al. 2018; Morais et al. 2021). In this work, we focused on gut dysbiosis and the consequences of these disruptions on

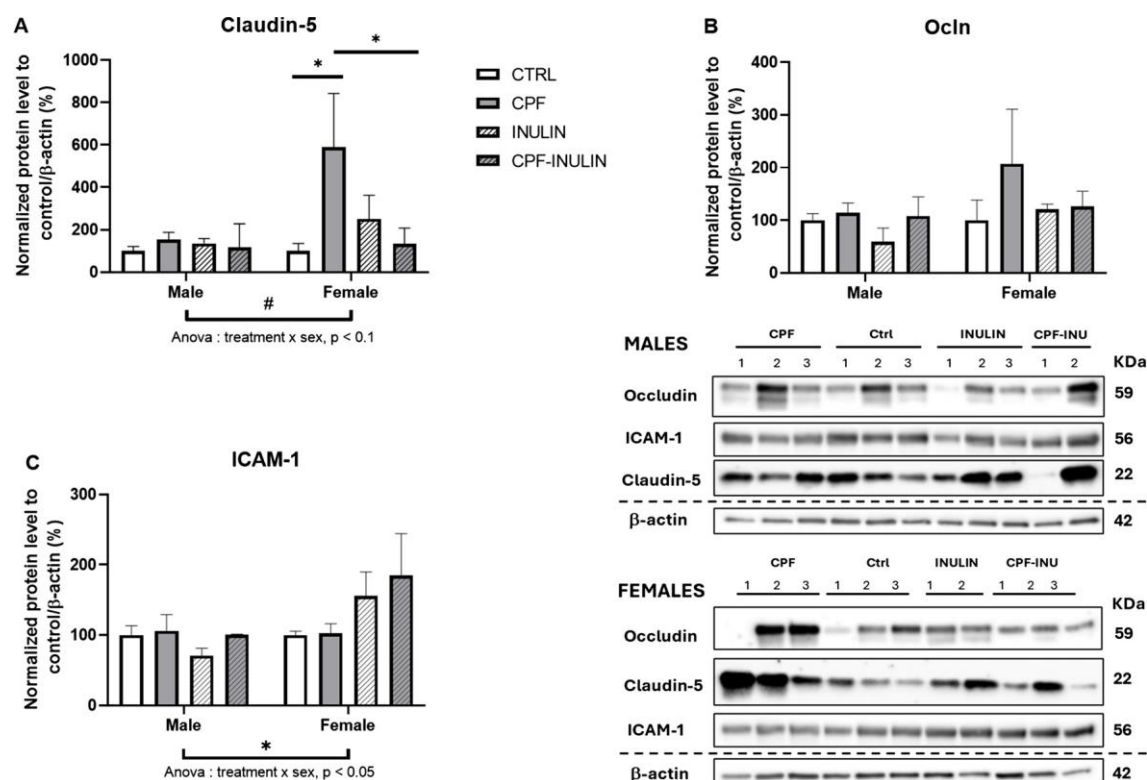


Fig. 5 Effects of chronic exposure to CPF and inulin on BBB tight junctions' protein levels in female and male progenies. Values are expressed as mean $\pm$ SEM using analysis of variance (two-way

ANOVA–Tukey multiple comparisons test). Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CTRL, control (100%); CPF, chlorpyrifos; inulin; CPF-inulin, chlorpyrifos + inulin

bacterial translocation to sterile organs and BBB tight junctions' expression in dams and progeny. Chronic exposure of dams only to 1 mg/kg/day of the organophosphate pesticide CPF during gestation and lactation had direct effects on GM and BBB tight junctions and adhesion molecule expression of dams and indirect effects on female and male progenies. Our animal model closely replicates the physiological events that occur during gestation. Our results revealed a significant impact on the bacterial composition of the intestinal microbiota, with marked changes in abundance and diversity of specific bacterial phyla. This highlights the complex interaction between pesticide exposure and the GM. CPF specifically disrupted gut bacteria balance, leading to intestinal dysbiosis in both dams and offspring. This dysbiosis led to bacterial translocation to sterile organs, reflecting a compromise in the IB integrity (Sarkar and Banerjee 2019; Di Vincenzo et al. 2023). Furthermore, our findings establish a causal link between alterations in the GM and disruptions in BBB integrity. The observed protective effects of inulin suggest potential therapeutic strategies for mitigating pesticide-induced dysbiosis. These findings were corroborated through multiple techniques, including bacterial isolation and identification, as well as the assessment of BBB gene and protein expression using RT-qPCR and Western blotting in brain microvessels-enriched fractions.

Impact of CPF on gut microbiota dysbiosis and bacterial translocation

In our previous published work, we demonstrated that CPF exposure induced body weight changes, disruption of lipid and glucose metabolisms in addition to dysbacteriosis in dams and progeny (Guibourdenche et al. 2021; Djekkoun et al. 2022a). Our present work confirmed these results regarding GM in male progeny where we can see a significant disruption of bacterial populations. We then compared male-related findings to our published results of female progeny and noticed that beneficial flora of male progeny showed the same significant decrease as for females, but potentially pathogenic flora had a more significant increase in male progeny compared to female exposed to CPF alone. Analysis of bacterial metabolites might explain this result. In fact, bacterial dysbiosis had an impact on the SCFAs (Joly Condet et al. 2022). As an example, we observed a significant increase of the acetic acid ratio in progeny and a significant decrease in butyric acid by CPF exposure, which was interestingly prevented by inulin. This shift in bacterial metabolites pattern is a result of the perturbation of intestinal homeostasis. As the microbial community is in continuous contact with the IB, microbial perturbations after CPF exposure have been shown to threaten the intestinal integrity

(Réquillé et al. 2018). These results confirm the decrease of beneficial bacterial flora and help us understand the subsequent mechanisms altering the IB permeability and leading to bacterial and metabolites translocation. Our results showed a large aerobic bacterial translocation to the spleen and liver in CPF groups. However, inulin prevented bacterial translocation.

Similar results in previous studies showed that CPF (0.3 and 1 mg/kg/day) exposure can disrupt the delicate balance of gut bacteria, specifically by affecting the diversity and abundance of beneficial bacteria contributing to gut dysbiosis (Joly Condette et al. 2015; Zhao et al. 2016; Perez-Fernandez et al. 2020). Since the GM is involved in the immune and endocrine systems, the consequences of CPF-associated dysbacteriosis on intestinal permeability and inflammation have been studied by our collaborators (Yang et al. 2020; Guibourdenche et al. 2021). In fact, a “leaky” IB showing a gene expression disruption of IB tight junctions was observed in male progeny of dams exposed to 1 mg/kg/day CPF during gestation and lactation. A significant decrease of occludin gene expression was detected in different intestinal segments in addition to alterations of zonula occludens and claudin 4 expression (Condette et al. 2014; Guibourdenche et al. 2021). A disruption of the mucus layer of the IB was also observed in the male progeny. These findings might explain the bacterial translocation that we observed in our microbiological study. No significant increased levels of pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharides (LPS) were observed although other published work found increased serum levels of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor (TNF- α) (Li et al. 2019).

Impact of CPF on brain microvessels (BBB)

Although existing literature demonstrates that pesticides can influence the microbiota and affect the BBB, our study represents the first demonstration of CPF's effects on brain microvessels following metabolism by the GM in an in vivo model.

CPF has been extensively documented to possess neurotoxic properties by altering the GM composition (Darwiche et al. 2018; El Khayat El Sabbouri et al. 2020; Cresto et al. 2023; Van Melis et al. 2023). Moreover, it has been shown that the GM plays an essential role in BBB permeability and can modulate tight junctions expression (Braniste et al. 2014). The BBB is an essential barrier in the brain and can be altered by in vitro CPF exposure. In vitro studies have shown that CPF can alter BBB integrity, with evidence of CPF and its metabolite such as CPF-oxon, crossing this barrier (Parran et al. 2005). CPF was detected on both the luminal and abluminal sides of the BBB, whereas the metabolites trichloro-2-pyridinol (TCP) and CPF-oxon were on the abluminal side only. These findings suggest that CPF can cross the BBB and that the barrier's enzymatic activity can

metabolize this pesticide (Parran et al. 2005). Additionally, Li and Ehrlich demonstrated decreased BBB electrical resistance and altered gene expression of claudin-5 and ZO-1 in vitro, indicating disruption and loss of BBB integrity (Li and Ehrlich 2013).

Our study builds on these findings by showing that CPF-induced dysbiosis affects BBB integrity through microbiota-mediated mechanisms. Previous studies added CPF directly to a BBB model, excluding the biotransformation of CPF by GM. In fact, CPF is 70% absorbed by the oral route, that is why studies on its effects on GM have been multiplied (Rathod and Garg 2017; Djekkoun et al. 2021, 2022a, b;) and have shown that *Lactobacillus fermentum* degrades CPF to TCP while *Lactobacillus lactis* and *Escherichia coli* to CPF-oxon.

We focused on microvessels as they are deemed a reliable representation of the BBB owing to their anatomical and functional resemblances to the barrier in vivo. This selection allowed us to explore the impacts of our experimental interventions on a system closely mirroring the complexities of the BBB, thus offering valuable insights into the mechanisms governing its regulation and function.

The comprehensive analysis of the RT-q PCR and western blot results revealed CPF capacity to modulate the gene expression of tight junctions both in dams and offspring, albeit with distinct effects observed between the two groups. The observed downregulation of CLDN 3, CLDN 5, OCLN, and ZO-1 mRNA levels following CPF exposure highlights the potential disruptive effects of CPF on BBB tight junctions in dams. Previous research has shown that the primary tight junction proteins intimately involved in maintaining the integrity of the BBB consist of CLDN5, CLDN3, and OCLN and a modulation of these genes can serve as an important biomarker for BBB permeability (Yuan et al. 2020). These alterations in tight junction protein expression may lead to increased permeability of the BBB, allowing for the unrestricted passage of potentially harmful substances into the CNS (Gosselet et al. 2021).

Our study aligns with previous research showing that pesticide exposure can impair BBB integrity by affecting tight junction proteins (Rempe et al. 2018). However, the effects varied between sexes: female progeny exhibited increased expression of CLDN5 and occludin, while male progeny showed decreased CLDN3 expression. These differential effects highlight the complex nature of pesticide-induced neurotoxicity and suggest a sex-dependent manner response to CPF with more pronounced effects in females.

This observation is consistent with the known role of CPF as an endocrine disruptor (Shaffo et al. 2018). The divergent effects observed in our study could be attributed to the interplay of biological factors influenced by sex, highlighting the intricate and potentially sex-specific consequences of CPF exposure on the expression of tight junction genes across different biological contexts.

Additionally, we observed a significant increase in pro-inflammatory markers ICAM-1 and NLRP3 gene expression in female progeny and TLR4 and NLRP3 in male progeny BBB, indicating CPF-induced neuroinflammation. This aligns with previous studies linking NLRP3 inflammasome activation in microglial cells by CPF exposure to neuroinflammation and its role in neurodegenerative diseases such as Parkinson and Alzheimer diseases (Weis et al. 2021). Thus, activation of neuroinflammation might explain CPF influence on BBB tight junctions.

Our exposure strategy confirmed CPF's direct effects on mothers during perinatal period and its indirect effects on the progeny. The emphasis on perinatal exposure arises from the acknowledgment that vulnerability to CPF is heightened during in utero development and early life due to the lower levels of the detoxifying enzyme paraoxonesterase in children compared to adults (Rathod and Garg 2017; Van der Zande et al. 2017). Consequently, CPF can elicit effects on neonates even at doses below those that inhibit AChE. Therefore, our study focuses on the impact of low chronic CPF exposure during the critical early days of life, referred to "windows of vulnerability" (Developmental Origins of Health and Disease DOHaD concept).

Prevention of CPF effects by inulin supplementation

Our nutritional prevention based on inulin supplementation showed potential benefits on both GM and BBB. Prebiotics are defined as ingredients that undergo selective fermentation, inducing specific modifications in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota, thereby providing health benefits to the host (Gibson et al. 2017). Previous in vivo and in vitro studies highlighted the beneficial effects of inulin supplementation that prevented gut dysbiosis and reduced bacterial translocation to sterile organs (to 0% in most cases) (Djekkoun et al. 2022a). Our results confirmed the beneficial effect of inulin supplementation on bacterial composition in male progeny. In fact, inulin male-exposed groups showed higher *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* (beneficial bacteria) counts than non-exposed to inulin groups and a significant decrease of *Escherichia coli* (potentially pathogenic bacteria) in groups exposed to inulin alone compared to CPF + inulin. Thus, our results of male progeny are consistent with our previous study on dams and their female progeny (Djekkoun et al. 2022a). We were able to confirm that inulin can restore gut "eubiosis". Our prevention strategy results corroborate with the findings of a study on zebrafish where the prebiotic countered pesticides effects (Yousefi et al. 2018). Furthermore, many in vivo studies have analyzed the bifidogenic effect of inulin on human GM. Carlett Ramirez-Farias and colleagues demonstrated that this dietary fiber increased specifically *Bifidobacterium* species: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum*, and *B. Bifidum*. When analyzing fecal fermentation products, they found that the most significant

change was the increase of lactate after 16 days of 10 g/day inulin intake (Ramirez-Farias et al. 2008). On the contrary CPF increased acetate and D-lactate but decreased L-lactate (Reygner et al. 2016). In fact, while inulin increased lactate by stimulating *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, CPF-related decrease in the release of lactate might favor the growth of the potentially pathogenic bacteria *Enterococcus* spp. (Joly et al. 2013). In addition, a recent key study found that pesticide exposure can lead to decreased lactate concentrations in men, indicating potential disruptions in glycolysis-related metabolism and energy homeostasis (Palaniswamy et al. 2023).

The effects of the prebiotic inulin on the BBB are still an area of ongoing research and exploration. Inulin, as a prebiotic, has primarily been studied for its effects on gut health and modulation of the GM. However, emerging evidence suggests that GM can influence various aspects of brain function, including BBB integrity. This prebiotic seems to reinforce the morphometry of the IB by enhancing tight junctions' activity. This was confirmed by reduced bacterial translocation by inulin, as our results showed. Some studies have investigated the potential neuroprotective effects of inulin through its modulation of the GM and subsequent impact on systemic inflammation and neuroinflammation (Hoffman et al. 2019). Since inflammation can influence BBB permeability, there is interest in understanding whether inulin supplementation could indirectly affect BBB function.

Our RT qPCR results showed that tight junctions' expression in CPF + inulin dams seem to be closer to control levels than CPF alone-exposed dams. Furthermore, especially in female progeny, we observed a restoration of CLDN5 and OCLN mRNA levels (expression values in inulin and CPF + inulin groups are similar to those of the control group, contrary to the significant increase by CPF alone (vs. control)). This gene expression restoration was also found in the case of pro-inflammatory factors such as NLRP3 in female (CPF + inulin group) and male progeny (inulin and CPF + inulin groups), ICAM-1 in female progeny, and TLR4 in male progeny. While CPF exposure increased the expression of these molecules, inulin was able to decrease it to control levels for some, except for the case of CLDN3 where inulin did not seem to hinder CPF effects in progeny.

These first results on BBB give promising insights about the direct (dams) and indirect (progeny) beneficial effects of inulin in organs outside of GM. This indicates that GM beneficial modulation by inulin enhances brain protection by restoring BBB tight junctions, highlighting its role in gut-brain axis communication and neuroprotection (Sheng et al. 2023). The outcomes obtained from our experiments have yielded significant information regarding the impact of pesticide exposure and inulin supplementation on the BBB.

Nonetheless, we could not compare results of BBB to those in literature since our study is the first in vivo experiment to analyze the impact of CPF and inulin on BBB. Consequently,

we compared these findings to research about inulin supplementation but in a different scenario (with no pesticide exposure) of mice with chronic unpredictable mild stress (CUMS mice) that have higher BBB permeability allowing pro-inflammatory cytokines diffusion to brain. In this study, CUMS mice supplemented with inulin showed a restoration of CLDN5 and ZO-1 levels and reversed the brain inflammatory response to CUMS by inhibition of TLR4-MyD88-NF- κ B pathway to decrease TLR4 and LPS in brain (Wang et al. 2023). These results highlight the neuroprotective role of inulin fermentation metabolites (SCFAs) that can cross the BBB (Dalile et al. 2019). Another study sought to counter the CPF neurotoxicity by supplementation with another molecule: Hesperidin, a flavonoid which has been shown to exert antioxidant and anti-inflammatory effects. Supplementation with Hesperidin (50 and/or 100 mg/kg) of CPF-exposed rats (6.75 mg/kg) increased antioxidant enzymes, decreased reactive oxygen species, and reduced inflammation by inhibiting NF- κ B pathway in brain (Küçükler et al. 2024). There remains a scarcity of in vivo studies, and none have specifically examined the impact on microvessels (Cresto et al. 2023). Further analysis should be done to understand how inulin fermentation products modulate BBB tight junctions. Conducting additional analyses using immunohistology to examine the levels of tight junction proteins at various locations can enhance our comprehension of how the expression of these proteins is affected by external factors. In perspective, our discoveries concerning CPF alone prompt consideration of the impact of exposure to a mixture of pesticides on our well-being, especially among vulnerable groups such as pregnant women and newborns (Zhang et al. 2022, 2023). Given our research focus on pesticide exposure during prenatal development, it would be valuable to explore the epigenetic consequences of CPF to understand the transgenerational effect observed in offspring (Chiu et al. 2021).

Conclusion

In conclusion, our study confirmed that long-term maternal exposure to deleterious environmental factors disrupts gut microbiota homeostasis, composition, and functions. Given the persistence of CPF residues in the environment and their potential link to various diseases, understanding the consequences of bacterial dysbiosis on the BBB integrity is crucial (Chin-Chan et al. 2015; Van Melis et al. 2023). We demonstrated that GM dysbiosis and subsequent bacterial translocation significantly impact the BBB, offering insights into the mechanisms that may underlie neurological disorders. Our findings suggest that prebiotic supplementation offers potential preventive measures against the adverse effects of everyday pesticide exposure. However, further research is necessary to determine the most effective prebiotic treatment

approaches, including optimal dosage and duration. Additionally, raising public awareness about the health risks associated with pesticide exposure and advocating for stricter pesticide regulations are essential to minimize environmental contamination and protect human health.

Abbreviations

ACh: Acetylcholine; *AChE*: Acetylcholinesterase; *AKT*: Alpha-serine/threonine kinase; *BBB*: Blood–brain barrier; *BCRP*: Breast cancer-resistant protein; *BSA*: Bovine serum albumin; *BW*: Body weight; *CFU*: Colony forming unit; *CLDN*: Claudin; *CNS*: Central nervous system; *CPF*: Chlorpyrifos; *CPFI*: Chlorpyrifos + inulin; *CPF-oxon*: Chlorpyrifos-oxon; *CUMS*: Chronic unpredictable mild stress; *DDT*: Dichloro-diphenyl-trichloroethane; *DOHaD*: Developmental origins of health and disease; *g*: Gram; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GM*: Gut microbiota; *HBSS*: Hank's balanced salt solution; *HEPES*: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; *HRP*: Horse radish peroxidase; *I*: Inulin; *IB*: Intestinal barrier; *ICAM-1*: Intercellular adhesion molecule 1; *IL*: Interleukin; *JNK*: C-Jun NH₂-terminal protein kinase; *kg*: Kilogram; *L*: Liter; *LPS*: Lipopolysaccharides; μ g: Microgram; μ M: Micromolar; *mg*: Milligram; *mL*: Milliliter; *mRNA*: Messenger ribonucleic acid; *MyD88*: Myeloid differentiation primary response protein 88; *NF- κ B*: Nuclear factor-kappa B; *ng*: Nanogram; *NLRP3*: NLR family pyrin domain containing 3; *nm*: nanometer; *NOAEL*: No-observed-adverse-effect level; *OCN*: Occludin; *PI3K*: Phosphoinositide 3-kinase; *PND*: Post natal day; *RNA*: Ribonucleic acid; *RNase*: ribonuclease; *RT-q PCR*: Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction; *rpm*: Revolutions per minute; *RIPA*: Radioimmunoprecipitation assay buffer; *SC*: Diet standard chow diet; *SCFAs*: Short-chain fatty acids; *SEM*: Standard error of the mean; *TBST*: Tris-buffered saline containing 0.1% Tween; *TCP*: 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol; *TJ*: Tight junctions; *TLR4*: Toll-like receptor 4; *TNF- α* : Tumor necrosis factor; *VCAM-1*: Vascular cell adhesion molecule 1; *ZO*: Zonula occludens

Author contribution Conceptualization, P. C. and H. K-C; methodology, P. C., H. K-C., M-C. B., L. D., A. C., and M. B.; software, M. AD, N. D. and M-C. B.; validation, P. C., H. K-C, F. G, and V. B.; formal analysis, M. AD, N. D., M-C. B., L. D., P. C., and H. K-C; investigation, M. AD, N. D., P. C., and H. K-C; resources, F. G and V. B.; data curation, M. AD, N. D., and M-C. B.; writing—original draft preparation, M. AD, N. D., M-C. B, L. D., P. C., H. K-C, F. G, and V. B.; writing—review and editing, M. AD, N. D., M-C. B, L. D., M. B., P. C., H. K-C, F. G, and V. B.; visualization, M. AD, N. D., P. C., and H. K-C; supervision, P. C., H. K-C, F. G, and V. B.; project administration, P. C. and H. K-C; funding acquisition, P. C. and H. K-C. All the authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This research received funding from the French State and the Hauts-de-France Region as part of CPER MOSOPS 2021–2027 project. Maria Abou Diwan received a doctoral fellowship from the “Conseil régional du Nord-Pas-de-Calais” (50%), Picardy University (25%), and the Artois University (25%). The animal experiment was supported by the Ministry of Higher Education, Research and Innovation and National Institutes of Health and Hauts-de-France region.

Data availability Data is available on demand by email to the corresponding author.

Declarations

Ethics approval The study protocol was approved by the Regional Directorate for Health, Animal Protection, and the Environment (Amiens, France) and the French Ministry of Research (reference: APAFIS # 8207–2016121322563594 v2, September 5th, 2017). All the animals were treated in accordance with the European Union Directive 2010/63 and monitored daily for well-being.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Competing interests The authors declare no competing interests.

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

References

- Abou Diwan M, Lahimer M, Bach V, Gosselet F, Khorsi-Cauet H, Candela P (2023) Impact of pesticide residues on the gut-microbiota-blood-brain barrier axis: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* 24(7):6147. <https://doi.org/10.3390/ijms24076147>
- Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C et al (2019) Pesticides, history, and classification. *Nat Remedies Pest Dis Weed Control* 29–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>
- Appleton J (2018) The gut-brain axis: influence of microbiota on mood and mental health. *Integr Med* 17(4):28
- Balaguer-Trias J, Deepika D, Schuhmacher M, Kumar V (2022) Impact of contaminants on microbiota: linking the gut–brain axis with neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health* 19(3):1368. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031368>
- Bonnema AL, Kolberg LW, Thomas W, Slavin JL (2010) Gastrointestinal tolerance of chicory inulin products. *J Am Diet Assoc* 110:865–868. <https://doi.org/10.1016/J.JADA.2010.03.025>
- Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, Korecka A, Bakocovic N, Ng LG, Kundu P, Gulyás B, Halldin C, Hultenby K, Nilsson H, Hebert H, Volpe BT, Diamond B, Pettersson S (2014) The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 6(263):263ra158. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B (2015) Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci* 9:1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00124>
- Chiu KC, Sisca F, Ying JH et al (2021) Prenatal chlorpyrifos exposure in association with PPAR γ H3K4me3 and DNA methylation levels and child development. *Environ Pollut* 274:116511. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2021.116511>
- Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C et al (2005) Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 85:734–746. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700281>
- Comfort N, Re DB (2017) Sex-specific neurotoxic effects of organophosphate pesticides across the life course. *Curr Environ Heal Rep* 4:392–404. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0171-y>
- Cresto N, Forner-Piquer I, Baig A et al (2023) Pesticides at brain borders: impact on the blood-brain barrier, neuroinflammation, and neurological risk trajectories. *Chemosphere* 324:138251. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138251>
- Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K (2019) The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- Darwiche W, Gay-Quéheillard J, Delanaud S, El Khayat El Sabbouri H, Khachfe H, Joumaa W, Bach V, Ramadan W (2018) Impact of chronic exposure to the pesticide chlorpyrifos on respiratory parameters and sleep apnea in juvenile and adult rats. *PLoS One* 13(1):e0191237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191237>
- Deepika D, Kumar S, Bravo N et al (2022) Chlorpyrifos, permethrin and cyfluthrin effect on cell survival, permeability, and tight junction in an in-vitro model of the human blood-brain barrier (BBB). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.09.010>
- Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V et al (2023) Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med*. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
- Djekkoun N, Lalau JD, Bach V et al (2021) Chronic oral exposure to pesticides and their consequences on metabolic regulation: role of the microbiota. *Eur J Nutr* 60:4131–4149. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02548-6>
- Djekkoun N, Depeint F, Guibourdenche M et al (2022) Chronic perigestational exposure to chlorpyrifos induces perturbations in gut bacteria and glucose and lipid markers in female rats and their offspring. *Toxics* 10(3):138
- Djekkoun N, Depeint F, Guibourdenche M et al (2022b) Perigestational exposure of a combination of a high-fat diet and pesticide impacts the metabolic and microbiotic status of dams and pups; a preventive strategy based on prebiotics. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-03063-y>
- El Khayat El Sabbouri HEK, Gay-Quéheillard J, Joumaa WH et al (2020) Does the perigestational exposure to chlorpyrifos and/or high-fat diet affect respiratory parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats? *Food Chem Toxicol* 140:111322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111322>
- Gao B, Bian X, Mahub R, Lu K (2017) Sex-specific effects of organophosphate diazinon on the gut microbiome and its metabolic functions. *Environ Health Perspect* 125:198–206. <https://doi.org/10.1289/EHP202>

- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME et al (2017) Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14:491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gosselet F, Azevedo R, Roig A et al (2021) Neurochemistry International central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 144:104952. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104952>
- Guardia-Escote L, Basaure P, Blanco J et al (2018) Postnatal exposure to chlorpyrifos produces long-term effects on spatial memory and the cholinergic system in mice in a sex- and APOE genotype- dependent manner. *Food Chem Toxicol* 122:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.069>
- Guibourdenche M, El Sabbouri HEK, Djekkoun N et al (2021) Programming of intestinal homeostasis in male rat offspring after maternal exposure to chlorpyrifos and/or to a high fat diet. *Sci Rep* 11:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90981-2>
- Hoffman JD, Yanckello LM, Chlipala G et al (2019) Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221828>
- Holscher HD, Doligale JL, Bauer LL et al (2014) Gastrointestinal tolerance and utilization of agave inulin by healthy adults. *Food Funct* 5:1142–1149. <https://doi.org/10.1039/C3FO60666J>
- Jin C, Zeng Z, Fu Z, Jin Y (2016) Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice. *Chemosphere* 160:349–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.105>
- Joly C, Gay-Quéheillard J, Léké A et al (2013) Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®) and in the rat. *Environ Sci Pollut Res* 20:2726–2734. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1283-4>
- Joly Condette C, Khorsi-Cauet H, Morlière P et al (2014) Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS One* 9(7):e102217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102217>
- Joly Condette C, Bach V, Mayeur C et al (2015) Chlorpyrifos exposure during perinatal period affects intestinal microbiota associated with delay of maturation of digestive tract in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 61:30–40. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000734>
- Joly Condette C, Djekkoun N, Reygnier J et al (2022) Effect of daily co-exposure to inulin and chlorpyrifos on selected microbiota endpoints in the SHIME® model. *Environ Pollut* 302:118961. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118961>
- Küçükler S, Caglayan C, Özdemir S et al (2024) Hesperidin counteracts chlorpyrifos-induced neurotoxicity by regulating oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Metab Brain Dis* 39:509–522. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01339-8>
- Lahimer M, Djekkoun N, Tricotteaux-Zarqaoui S et al (2023) Impact of perinatal coexposure to chlorpyrifos and a high-fat diet on kisspeptin and GnRHR presence and reproductive organs. *Toxicol* 11:789. <https://doi.org/10.3390/TOXICS11090789>
- Lee B, Moon KM, Kim CY (2018) Review article tight junction in the intestinal epithelium: its association with diseases and regulation by phytochemicals. *J Immunol Res* 2018(1):2645465
- Li W, Ehrlich M (2013) Transient alterations of the blood-brain barrier tight junction and receptor potential channel gene expression by chlorpyrifos. *J Appl Toxicol* 33:1187–1191. <https://doi.org/10.1002/jat.2762>
- Li JW, Fang B, Pang GF et al (2019) Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats. *Pestic Biochem Physiol* 159:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.018>
- Matsuzaki R, Gunnigle E, Geissen V et al (2023) Pesticide exposure and the microbiota-gut-brain axis. *ISME J* 17:1153–1166. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01450-9>
- Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK (2021) The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 19:241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Mostafalou S, Abdollahi M (2016) Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Palaniswamy S, Abass K, Rysä J et al (2023) Investigating the relationship between non-occupational pesticide exposure and metabolomic biomarkers. *Front Public Heal* 11:1248609. <https://doi.org/10.3389/FPUH.2023.1248609/BIBTEX>
- Parran DK, Magnin G, Li W et al (2005) Chlorpyrifos alters functional integrity and structure of an in vitro BBB model: co-cultures of bovine endothelial cells and neonatal rat astrocytes. *Neurotoxicology* 26:77–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2004.07.003>
- Perez-Fernandez C, Morales-Navas M, Guardia-Escote L et al (2020) Long-term effects of low doses of chlorpyrifos exposure at the preweaning developmental stage: a locomotor, pharmacological, brain gene expression and gut microbiome analysis. *Food Chem Toxicol* 135:110865. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110865>
- Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z et al (2008) Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii. *Br J Nutr* 101:541–550. <https://doi.org/10.1017/S0007114508019880>
- Rathod AL, Garg RK (2017) Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: a forensic perspective with reference to Indian scenario. *J Forensic Leg Med* 47:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.02.003>
- Réquilé M, González Alvarez DO, Delanaud S et al (2018) Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. *Environ Sci Pollut Res* 25:22529–22540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2332-4>
- Rempe RG, Hartz AMS, Soldner ELB, Sokola BS, Alluri SR, Abner EL, Kryscio RJ, Pekcec A, Schlichtiger J, Bauer B (2018) Matrix metalloproteinase-mediated blood-brain barrier dysfunction in epilepsy. *J Neurosci* 38(18):4301–4315. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2751-17.2018>
- Reygnier J, Condette CJ, Bruneau A et al (2016) Changes in composition and function of human intestinal microbiota exposed to chlorpyrifos in oil as assessed by the SHIME® model. *Int J Environ Res Public Health* 13(11):1088. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111088>
- Sarkar SR, Banerjee S (2019) Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol* 328:98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.004>
- Shaffo FC, Grodzki AC, Schelegle ES, Lein PJ (2018) The organophosphorus pesticide chlorpyrifos induces sex-specific airway hyper-reactivity in adult rats. *Toxicol Sci* 165:244–253. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFY158>
- Sheng W, Ji G, Zhang L (2023) Immunomodulatory effects of inulin and its intestinal metabolites. *Front Immunol* 14:1224092. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1224092/BIBTEX>
- Supreeth M, Raju N (2017) Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:5961–5971. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8401-7>
- Uerlings J, Schroyen M, Willems E et al (2020) Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells. *J Funct Foods* 67:103855. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103855>

- Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 361:k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Van der Zande ISE, van der Graaf R, Oudijk MA et al (2017) Vulnerability of pregnant women in clinical research. 1–7. <https://doi.org/10.1136/medethics-2016-103955>
- Van Melis LVJ, Heusinkveld HJ, Langendoen C et al (2023) Organophosphate insecticides disturb neuronal network development and function via non-AChE mediated mechanisms. *Neurotoxicology* 94:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.11.002>
- Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L (2016) Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front Microbiol* 7:1144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01144>
- Versele R, Sevin E, Gosselet F, Fenart L, Candela P (2022) TNF- α and IL-1 β Modulate blood-brain barrier permeability and decrease amyloid- β peptide efflux in a human blood-brain barrier Model. *Int J Mol Sci* 23(18):10235. <https://doi.org/10.3390/ijms231810235>
- Wang L, Wang Z, Lan Y et al (2023) Inulin attenuates blood-brain barrier permeability and alleviates behavioral disorders by modulating the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in mice with chronic stress. *J Agric Food Chem* 71:13325–13337. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C03568/ASSET/IMAGES/LARGE/JF3C03568_0007.JPEG
- Weis GCC, Assmann CE, Mostardeiro VB et al (2021) Chlorpyrifos pesticide promotes oxidative stress and increases inflammatory states in BV-2 microglial cells: a role in neuroinflammation. *Chemosphere* 278:130417. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130417>
- Yang X, Yu D, Xue L et al (2020) Probiotics modulate the microbiota-gut-brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharm Sin B* 10:475–487. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.07.001>
- Yousefi S, Hoseinifar SH, Paknejad H, Hajimoradloo A (2018) The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 73:192–196. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.12.022>
- Yuan S, Liu K, Qi Z (2020) Occludin regulation of blood–brain barrier and potential therapeutic target in ischemic stroke. *Brain Circ* 6:152. https://doi.org/10.4103/BC.BC_29_20
- Zhang W, Fan R, Luo S et al (2022) Combined effects of chlorpyrifos and cyfluthrin on neurobehavior and neurotransmitter levels in larval zebrafish. *J Appl Toxicol* 42:1662–1670. <https://doi.org/10.1002/JAT.4334>
- Zhang D, Ding W, Liu W et al (2023) Single and combined effects of chlorpyrifos and glyphosate on the brain of common carp: based on biochemical and molecular perspective. *Int J Mol Sci* 24(16):12934. <https://doi.org/10.3390/ijms241612934>
- Zhao Y, Zhang Y, Wang G et al (2016) Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere* 153:287–293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.055>

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

Etude in vitro des effets du pesticide Chlorpyrifos et la prévention par l'inuline

A. Résumé

L'axe intestin-cerveau, reliant le microbiote intestinal (MI) au cerveau, repose sur une communication bidirectionnelle passant par les barrières physiologiques, notamment la barrière intestinale (BI), qui limite l'absorption de contaminants, et la barrière hémato-encéphalique (BHE), protégeant le cerveau des toxines. Longtemps sous-estimé, cet axe joue un rôle crucial dans le maintien de la santé mentale et physique.

Des études animales ont révélé que l'exposition aux pesticides peut perturber le MI et compromettre la BI et la BHE, entraînant des effets néfastes pour la santé. Le Chlorpyrifos (CPF), un insecticide organophosphoré connu pour sa neurotoxicité et ses effets de perturbation endocrinienne, provoque une dysbiose intestinale marquée par la diminution de bactéries bénéfiques et la prolifération de pathogènes potentiels. Ce déséquilibre favorise la translocation bactérienne à travers la BI, altérant aussi l'intégrité de la BHE, ce qui renforce les risques de désordres métaboliques et inflammatoires (article 1).

Le MI joue un rôle clé dans la protection de la BI et de la BHE; en conséquence, la dysbiose accroît la perméabilité intestinale, génère une inflammation chronique et facilite la translocation bactérienne et des processus souvent associés aux troubles neurologiques. Ce déséquilibre peut s'aggraver durant la grossesse, une période caractérisée par des modifications hormonales et immunitaires affectant le MI. La dysbiose induite par le CPF pourrait ainsi entraîner des répercussions uniques chez la femme enceinte, avec des implications pour la santé de la mère et du fœtus.

Cette étude examine les effets du CPF sur le MI, la BI et la BHE, en intégrant l'inuline comme prébiotique pour contrer les effets néfastes du pesticide. Trois modèles in vitro combinés ont été utilisés : le simulateur SHIME® pour le MI, un modèle de BI utilisant des cellules Caco-2, et un modèle de BHE basé sur des co-cultures de cellules endothéliales et de péricytes. Des échantillons de fèces de femmes en âge de procréer et enceintes ont permis d'observer les effets différenciés du CPF sur le MI, la perméabilité des barrières et la translocation bactérienne pendant la grossesse.

Les analyses microbiologiques des surnageants du SHIME®, incluant la culture bactérienne, la quantification des acides gras à chaîne courte (AGCC) et des métabolites du CPF, ont mis en évidence un déséquilibre intestinal marqué, avec une augmentation des bactéries pathogènes chez les femmes, qu'elles soient enceintes ou non, exposées au CPF. Cette dysbiose a entraîné des modifications des ratios d'AGCC, une perméabilité accrue de la BI et une translocation bactérienne accrue, sans effet significatif sur la perméabilité de la BHE. La supplémentation en inuline a permis de restaurer l'équilibre microbien

et de prévenir la translocation bactérienne, démontrant ainsi son potentiel protecteur contre la dysbiose induite par le CPF.

Ces résultats confirment les observations antérieures des effets délétères du CPF sur le MI et l'intégrité des barrières physiologiques, indiquant que le CPF altère les protéines de jonction serrée dans les cellules épithéliales et favorise une perméabilité accrue de la BI. Les effets similaires observés pour d'autres pesticides, tels que le Diazinon, le glyphosate, ou le fongicide Imazalil, révèlent une tendance générale des contaminants à induire un déséquilibre microbien, une inflammation accrue, et des altérations de la BI, augmentant les risques de maladies inflammatoires.

L'inuline, par ses effets bénéfiques sur l'équilibre microbien et la fonction de la BI, émerge comme une intervention prometteuse pour atténuer les effets délétères des pesticides comme le CPF, en particulier pour le maintien de l'intégrité de la BI et de la BHE. Contrairement aux études ciblant uniquement la BI ou le MI, notre travail explore de manière novatrice l'axe MI-BHE, soulignant l'importance d'évaluer les effets des pesticides sur plusieurs barrières biologiques, surtout chez les populations vulnérables telles que les femmes enceintes. Nos résultats mettent en lumière l'intérêt de l'inuline comme intervention bénéfique et soulignent la nécessité de combiner modèles *in vitro* et études *in vivo* pour mieux comprendre les effets à long terme des contaminants environnementaux sur la santé humaine.

Pour finir, cette étude offre une perspective approfondie sur les risques de santé associés à l'exposition au CPF chez les femmes, avec des implications majeures pour la santé maternelle et fœtale, et rappelle l'importance d'inclure les états physiologiques spécifiques, comme la grossesse, dans les études toxicologiques.

B. Article de l'étude in vitro

Article soumis le 29 octobre 2024

dans le journal Environmental Pollution (IF : 7.6) (accepté le 12 décembre 2024)

Effects of Chlorpyrifos on gut dysbiosis and barriers integrity in women with a focus on pregnancy and prebiotic intervention: insights from advanced in vitro human models

Maria Abou Diwan^{1,2}, Avénie Huet³, Juliette Poiriez², Claire-Joly Condette¹, Stéphane Delanaud¹, Emmanuel Sevin², Aurélie corona¹, Larbi Rhazi⁴, Flore Depeint⁴, Halima Ouadid-Ahidouch³, Fabien Gosselet², Véronique Bach¹, Pietra Candela^{2,†} and Hafida Khorsi-Cauet^{1,*,†}

¹ PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01 UPJV/INERIS, Centre Universitaire de Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens, France

² Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300 Lens, France

³ Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire (LPCM), UR UPJV 4667, Université Picardie Jules Verne, UPJV, 80039 Amiens, France

⁴ UP 2018.C103 Transformations & Agro-Ressources, Institut Polytechnique UniLaSalle, Beauvais, France

*Correspondence: hafida.khorsi@u-picardie.fr

† These authors contributed equally to this work.

Environmental Pollution

Effects of Chlorpyrifos on gut dysbiosis and barriers integrity in women with a focus on pregnancy and prebiotic intervention: insights from advanced in vitro human models

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Legacy/emerging organic contaminants, microplastics, passive sampling technologies
Keywords:	Gut-microbiota-BBB axis; Chlorpyrifos; Pregnant women, human in vitro models, Pesticide-induced gut dysbiosis, Bacterial translocation
Corresponding Author:	Hafida Khorsi-Cauet University of Picardy Jules Verne FRANCE
First Author:	Maria Abou Diwan
Order of Authors:	Maria Abou Diwan Avénie Huet Juliette Poiriez Claire-Joly Condette Stéphane Delanaud Emmanuel Sevin Aurélié Corona Larbi Rhazi Flore Depeint Halima Ouadid-Ahidouch Fabien Gosselet Véronique Bach Pietra Candela Hafida Khorsi-Cauet
Abstract:	Chlorpyrifos (CPF), a commonly used organophosphate pesticide, poses potential risks to human health, particularly affecting the gut microbiota (GM), intestinal barrier (IB), and blood-brain barrier (BBB). CPF-induced gut dysbiosis compromises the integrity of both the IB and the BBB, leading to increased intestinal permeability, inflammation, and bacterial translocation, all of which may impact neurological health. Although CPF's effects on the GM are documented, limited research explores how these impacts differ in women, particularly during pregnancy. To address this gap, this study investigates CPF's effects using three advanced human in vitro models: the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) to mimic the gut environment of women of child-bearing age and pregnant women, a Caco-2 model for the IB, and a BBB model to assess CPF's effects and the protective role of the prebiotic inulin. Microbiological analyses of SHIME® supernatants, including bacterial culture and quantification of short-chain fatty acids (SCFAs) and CPF metabolites, were conducted to assess gut composition and pesticide degradation. We also examined the effects of CPF-induced dysbiosis on IB and BBB permeability to FITC-Dextran, focusing on bacterial translocation after 4 hours of exposure to CPF-treated SHIME® supernatants. Our results revealed significant intestinal imbalance, marked by an increase in potentially pathogenic bacteria in the GM of both non-pregnant and pregnant women exposed to CPF. This dysbiosis led to a significant shift in SCFAs ratio and increased IB permeability and bacterial translocation across the IB, but not the BBB. Notably, inulin supplementation restored GM balance and prevented bacterial translocation,

Powered by Editorial Manager® and Prodxion Manager® from Aries Systems Corporation

Effects of Chlorpyrifos on gut dysbiosis and barriers integrity in women with a focus on pregnancy and prebiotic intervention: insights from advanced in vitro human models

Maria Abou Diwan^{1,2}, Avénie Huet³, Juliette Poiriez², Claire-Joly Condette¹, Stéphane Delanaud¹, Emmanuel Sevin², Aurélie corona¹, Larbi Rhazi⁴, Flore Depeint⁴, Halima Ouadid-Ahidouch³, Fabien Gosselet², Véronique Bach¹, Pietra Candela^{2,†} and Hafida Khorsi-Cauet^{1,*,†}

¹ PERITOX—Périnatalité et Risques Toxiques—UMR_I 01 UPJV/INERIS, Centre Universitaire de Recherche en Santé, CURS-UPJV, University of Picardie Jules Verne, CEDEX 1, 80054 Amiens, France

² Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique (LBHE), UR 2465, University of Artois, 62300 Lens, France

³ Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire (LPCM), UR UPJV 4667, Université Picardie Jules Verne, UPJV, 80039 Amiens, France

⁴ UP 2018.C103 Transformations & Agro-Ressources, Institut Polytechnique UniLaSalle, Beauvais, France

*Correspondence: hafida.khorsi@u-picardie.fr

† These authors contributed equally to this work.

Highlights

- Novelty: first in vitro study assessing combined effects of pesticides and prebiotics on the blood–brain barrier (BBB) using 3 human models
- Chlorpyrifos (CPF) disrupts gut microbiota (GM) and short-chain fatty acid ratios with more pronounced effects in pregnant women.
- CPF increases intestinal permeability and bacterial translocation but not across the BBB
- Inulin dietary fiber restores GM balance and intestinal permeability

Abstract

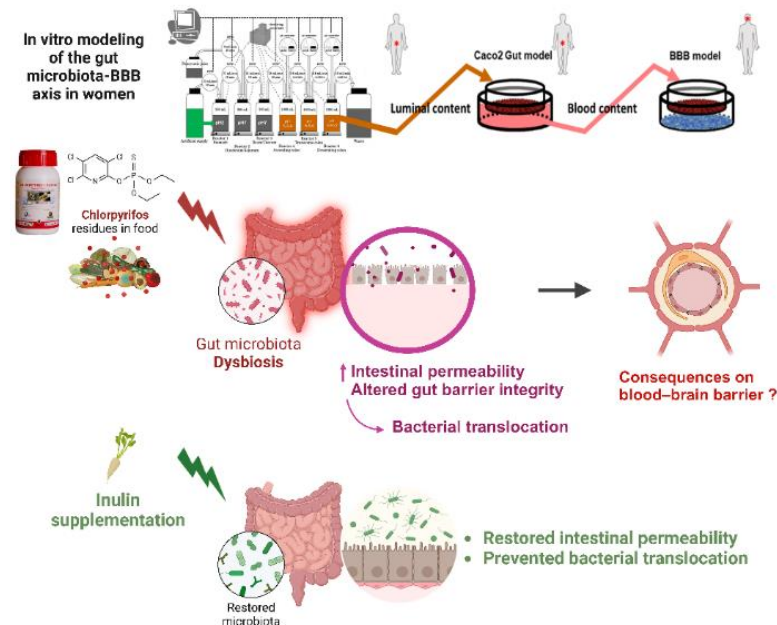
Chlorpyrifos (CPF), a commonly used organophosphate pesticide, poses potential risks to human health, particularly affecting the gut microbiota (GM), intestinal barrier (IB), and blood-brain barrier (BBB). CPF-induced gut dysbiosis compromises the integrity of both the IB and the BBB, leading to increased intestinal permeability, inflammation, and bacterial translocation, all of which may impact neurological health. Although CPF's effects on the GM are documented, limited research explores how these impacts differ in women, particularly during pregnancy. To address this gap, this study investigates CPF's effects using three advanced human in vitro models: the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) to mimic the gut environment of women of child-bearing age and pregnant women, a Caco-2 model for the IB, and a BBB model to assess CPF's effects and the protective role of the prebiotic inulin.

Microbiological analyses of SHIME® supernatants, including bacterial culture and quantification of short-chain fatty acids (SCFAs) and CPF metabolites, were conducted to assess gut composition and pesticide degradation. We also examined the effects of CPF-induced dysbiosis on IB and BBB permeability to FITC-Dextran, focusing on bacterial translocation after 4 hours of exposure to CPF-treated SHIME® supernatants.

Our results revealed significant intestinal imbalance, marked by an increase in potentially pathogenic bacteria in the GM of both non-pregnant and pregnant women exposed to CPF. This dysbiosis led to a significant shift in SCFAs ratio and increased IB permeability and bacterial translocation across the IB, but not the BBB. Notably, inulin supplementation restored GM balance and prevented bacterial translocation, highlighting its potential as a preventive measure against CPF-induced dysbiosis.

This study enhances our understanding of the health risks associated with CPF exposure in women, with implications for maternal and fetal health, and underscores the importance of considering physiological states such as pregnancy in toxicological research.

Graphical abstract



Keywords: Gut-microbiota-BBB axis; Chlorpyrifos; Pregnant women, in vitro models, Pesticide-induced gut dysbiosis, Bacterial translocation

* Corresponding author. Tel.: +0-000-000-0000 ; fax: +0-000-000-0000 . E-mail address: hafida.khorsi@u-picardie.fr

1. Introduction

The link between the gut microbiota and the brain, often referred to as the gut-brain axis, describes the bidirectional communication between the gut microbiota (GM), which consists of the microorganisms living in the gut—mainly bacteria—and the "barriers" that separate it from the rest of the body (Morais et al. 2021). These barriers include the intestinal barrier (IB), which limits the absorption of food contaminants, and the blood-brain barrier (BBB), which restricts the entry of harmful molecules and cells into the brain (Abou Diwan et al. 2023). This axis of communication was long overlooked in medical and scientific research, but in recent decades, extensive studies have uncovered its critical role in both mental and physical health.

Animal studies indicate that the disruption of the GM due to pesticide exposure can impact human health by altering IB function and having long-term effects on the BBB (Joly Condette et al. 2016; Galea 2021; Balaguer-Trias et al. 2022). The pervasive use of pesticides in modern agriculture has raised significant concerns about their impact on the key players of gut-brain axis. Among these, chlorpyrifos (CPF), an organophosphate insecticide, has been widely used due to its effectiveness in pest control. CPF is a neurotoxic pesticide that inhibits acetylcholinesterase (AChE) which leads to an accumulation of acetylcholine, causing continuous nerve signal transmission. CPF has also been linked to endocrine disruption as this pesticide can interfere with the endocrine system by mimicking or blocking thyroid or reproductive hormones (Balaguer-Trias et al. 2022; Lahimer et al. 2023). However, its potential adverse effects on human health, particularly on GM, IB, and BBB, have not been extensively studied and have become a growing area of research. For instance, recent studies have shown that chronic CPF

exposure can lead to alterations in the GM, a condition known as dysbiosis that can cause harmful microbial metabolites to enter the bloodstream (bacterial translocation) across the IB (Zhao et al. 2016; Joly Condette et al. 2016; Linares et al. 2021). CPF exposure has been associated with an overgrowth of potentially harmful bacteria as well as a reduction in beneficial bacteria, mainly producing short-chain fatty acids (SCFAs), which play a crucial role in maintaining gut health and barrier function (Dalile et al. 2019). These changes in microbial composition and function can disrupt the homeostasis of the gut ecosystem, contributing to adverse health effects (Reygner et al. 2016a; Djekkoun et al. 2022a; Joly Condette et al. 2022).

Since the GM plays a crucial role in maintaining the integrity of IB and the BBB, dysbiosis can result in the impairment of both barriers (Réquilé et al. 2018; Doroszkiewicz et al. 2021; Di Vincenzo et al. 2023). These effects are thought to occur through mechanisms such as increased intestinal permeability, chronic inflammation, and bacterial translocation that influence neurological functions (Sampson et al. 2016; Nagpal and Yadav 2017; Rutsch et al. 2020). However, further research is needed to fully understand these complex interactions and to develop strategies for mitigating the potential health risks.

In addition, the effects of CPF on the GM are well-documented but there is a lack of research on how these effects vary in women, particularly during pregnancy. Hormonal and immunological changes during pregnancy can influence the composition of the GM (Edwards et al. 2017; Fuhler 2020). Consequently, pesticide-induced dysbiosis may differ between non-pregnant and pregnant women. As a result, the effects of dysbiosis on the IB and the BBB may vary depending on pregnancy status, potentially leading to distinct health impacts for both the mother and the fetus (Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) “windows of vulnerability”) (Wright 2017; Balaguer-Trias et al. 2022). In contrast, supplementation with the prebiotic inulin has been suggested as a potential strategy to mitigate pesticide effects, although little is known about its efficacy in women and pregnant individuals (Reygner et al. 2016b; Djekkoun et al. 2022a; Sheng et al. 2023; Wang et al. 2023).

Therefore, to address this research gap, it is important to study pesticide-induced dysbiosis during pregnancy and its effects on these critical body barriers. In particular, our study aims to evaluate the impact of CPF on the GM, the IB, and the BBB and was designed to analyze the potential beneficial effects of inulin during CPF exposure. We combined three original *in vitro* human models: (1) an artificial gut simulator SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) to mimic the human gut environment and assess the microbiota (Van de Wiele et al. 2015; Joly Condette et al. 2022), (2) a Caco-2 cell model to examine the IB (Sevin et al. 2013), and (3) an endothelial cell and pericyte co-culture model to investigate the BBB (Versele et al. 2022). By analyzing fecal samples from women of child-bearing age and pregnant women, we aim to elucidate how CPF affects the GM differently during pregnancy and to explore its consequences on IB and BBB permeability, as well as bacterial translocation across these barriers.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Chlorpyrifos ((O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl)-phosphorothioate) with 98.5 % purity, Sigma-Aldrich), being a lipophilic molecule, was dissolved in rapeseed oil prior to administration of 1 mg in the first in vitro reactor (stomach) containing 200 mL of sterile feed medium. Exposure to CPF started after 15 days of stabilization of the intestinal flora of the in vitro SHIME model.

2.2 In vitro models

SHIME® model

Definition of the model The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) (Van de Wiele et al. 2015; Joly Condette et al. 2022) model is an in vitro representation of the digestive tract, spanning from the stomach to the descending colon (R1 to R6). It comprises six distinct double-wall reactors connected by peristaltic pumps and is maintained at a constant temperature of 37°C with daily pH and redox voltage monitoring.

Feces collection The initiation of the SHIME® requires an inoculum of human feces. In this study, we used fecal inoculum from 2 groups of women volunteers: of reproductive age and pregnant. Our inclusion criteria selected five healthy adults for each group: with no symptoms of gastrointestinal diseases and were not treated with antibiotics during the six months prior to feces collection. The collection of women feces from the Amiens University Hospital, with the help of Dr. Arthur Foulon, and their inoculation in the SHIME® were approved by the Ethical committee for non-interventional research (CERNI) of Picardy Jules Verne University (Evaluation number 2023-07-5/2023-27).

SHIME experimental process A 15-day stabilization period of the microbiota (pH and redox potential) is required before beginning exposure. Supernatants from the in vitro digestion were collected on the 15th day of stabilization, representing the control, as well as 15 days and 30 days post-exposure to study respectively short-term and long-term effects of CPF alone and the combination of CPF and inulin (in the case of co-exposure to CPF and inulin, 10 g of inulin extract was added to the stomach directly after CPF solution addition (Joly Condette et al. 2022)). The supernatants were sampled three times in the final week of each period to allow statistical analysis.

Intestinal barrier model

Caco-2 cell culture protocol has been previously detailed in our colleagues previous studies (Sevin et al. 2013, 2019). Caco-2 cells (0.4×10^5 cells), at passage 026, were seeded in 25 cm² plastic flasks and maintained with complete medium, which was refreshed every two days. The medium consisted of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (4500 mg/L) with L-glutamine (584 mg/L), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FCS, Life Technologies, Waltham, MA, USA), 1% non-essential amino acids (excluding L-glutamine), and 1% penicillin-streptomycin solution. After

3 days of incubation, when the cells reached 80–90% confluence, they were trypsinized and reseeded at a density of 5×10^5 cells in 75 cm² flasks with complete medium. When the Caco-2 cells reached a high density (approximately 0.5×10^5 cells/cm²), after 5 to 6 days, they were passage into 6-well plate on 0.4 µm or 1 µm polycarbonate or polyethylene terephthalate membrane inserts respectively. Cells were seeded at densities of either 40 000 cells/cm² and cultured for 21–25 days in complete medium, with media changes every two days.

Human in vitro BBB model

The BBB model consisted of a co-culture of human brain pericytes (hBPs) in the lower compartment and human brain-like endothelial cells (hBLEC) on the Transwell insert. These cells were characterized for pericyte markers as described in previous published work (Menaceur et al. 2023). After thawing, hBPs (passages 15-25) were seeded in gelatin-coated Petri dishes and cultured in DMEM high glucose, FCS, L-glutamine, and antibiotics. Human hematopoietic stem cells were isolated from umbilical cord blood, with informed consent and approval from the French Ministry of Higher Education and Research, (CODECOH Number DC2011-1321) (Cecchelli et al. 2014; Heymans et al. 2020). These cells were sorted, cultured, and differentiated into ECs in EGM-2 medium with VEGF (PeproTech Inc, Cranbury, NJ, USA). For the BBB model, hBPs were seeded in gelatin-coated dishes, and CD34⁺ ECs were seeded on inserts (1 µm, SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) covered with Matrigel™ (Corning, NY, USA). After 6 days of co-culture of ECs with hBPs in a 12 well-plate (Costar, 3512, Corning, NY, USA), the BBB model is ready for treatment to SHIME supernatants

2.6 Microbiological and cellular analysis

2.6.1 SHIME® bacterial composition analysis

After a 15-day stabilization period of the SHIME® microbial flora, control samples were collected prior to exposure to CPF (or CPF+inulin) to identify the bacterial population (type and quantity in log CFU of bacteria) before exposure in 4 reactors: ileum, proximal colon, transverse colon and descending colon. Samples were collected again after 15 days of exposure and on the 30th day of exposure. To identify bacterial genera, various culture media were utilized, and inoculation was directly performed after sampling, using the bead spreading method in anaerobic and aerobic conditions.

2.6.2 SHIME® bacterial fermentation metabolites assay

SCFAs (acetate, butyrate and propionate) of R3 to R6 samples were analyzed by gas chromatography as previously described (Lecerf et al. 2012; Réquillé et al. 2018) with modifications. 1 mL of sample were centrifuged for 10 min at 10 000 g at 4 °C and filtered through regenerated cellulose syringe filter 0.45 µm. Then, 0.9 mL of supernatant was mixed with 100 µL of internal standard (methylbutyric acid). Short fatty acids were quantified using a gas chromatograph (FOCUS GC System, ThermoFisher Scientific) equipped with an autosampler (AS-3000, ThermoFisher Scientific) and a flame ionization

detector (FID). Samples (1 μ L) were injected in split mode (1/10) at 270 °C. Chromatographic separation was performed through a ZB-FFAP column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m, Phenomenex) with dihydrogen as the carrier gas at a 1 mL/min gas flow. The oven temperature program was defined as follows: isotherm at 100 °C for 2 min, temperature gradient from 100 °C to 145 °C at 10 °C/min, isotherm at 145 °C for 0.2 min, temperature gradient from 145 °C to 220 °C at 45 °C/min and final isotherm at 220 °C for 1 min. The FID detection was operated at 280 °C with dihydrogen and air flows at, respectively, 30 mL/min and 300 mL/min

2.6.3 Bacterial translocation across IB and BBB models

To check whether potential gut dysbiosis led to bacterial translocation across the IB, we applied 1/5 diluted SHIME® supernatants (distal colon alone R6 and a pool of the three colon segments) to the apical side of the IB model as previously described (Réquilé et al. 2018). Additionally, separate BBB model inserts were exposed to aliquots collected from Caco-2 basolateral compartment after SHIME® exposure to mimic gut microbiota-BBB “like” axis. We used bacterial culture methods to detect the translocation of bacteria that crossed the apical towards the basolateral compartment of barriers. Apical and basolateral aliquots were inoculated on bacterial culture media and were incubated at 37 °C for 24 to 48 hours. If bacterial translocation occurs, colonies are detected on Petri dishes where aliquots of basolateral compartment were inoculated. The resulting colonies were enumerated using an automated system (Scan® 500, Inter-science, St Nom la Bretèche, France) and expressed as log (Colony Forming Unit CFU). The percentage of translocation was calculated by dividing the colony count in basolateral compartment by the colony count in apical compartment and multiplying by 100 (Abou Diwan et al. 2024).

2.6.4 Permeability measurement during bacterial translocation experiment

Barriers' permeability to the non-permeant fluorescent molecule Fluorescent 4 KDa-Dextran (FD4) was measured in the Caco-2 and BBB models after 4 hours of exposure to 1/5 diluted SHIME® supernatants at 37 °C during the bacterial translocation experiment. FD4 is at a concentration of 40 μ M in Ringer HEPES solution that were used to dilute SHIME supernatants. Amount of FD4 in apical and basolateral compartments of cell culture was determined using fluorescence spectrophotometry at 495-525 nm (Bioteck, Synergy H1, Colmar, France). The permeability coefficient (P_e in cm/min) of FD4 was calculated in Ringer HEPES buffer using the previously established equation (Dehouck et al. 1990; Culot et al. 2008).

2.7 CPF assay in SHIME® reactors

CPF parent molecule and its metabolites assay in SHIME reactors (R1 to R6) was performed using liquid chromatography (LC) with a coupled mass spectrometer (MS) and a flight time model 6545 (MS-

QTOF) (Agilent, France) by the International Medical Institute of Toxicology and Pharmacology (IMITOX) as previously described (Brousse et al. 2019).

2.8 Statistical analysis

The bacterial composition data were expressed as mean $\pm$ standard error of mean (SEM). The SCFA data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 8.0.1 statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). One-way and two-way analyses of variance (ANOVA) were employed, with $p < 0.05$ being the statistical significance threshold for all analyses. The statistical analysis of permeability data expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) was conducted using the non-parametric test Kruskal-Wallis test.

3. Results

3.4 Gut microbiota bacterial composition

3.4.1 CPF exposure of women of childbearing age gut microbiota

After the microbiological analysis of isolated colonies on culture media, the results indicate whether short-term and/or long-term exposure to CPF impacts the GM of women of reproductive age. We chose to use bar charts to represent our findings, to facilitate comparison and more effectively highlight significant results. The x-axis represents the different reactors with a time scale (with bars assigned to each day: CPF 0 (control period), CPF 15 for short-term pesticide exposure and CPF 30 for long-term exposure for the different reactors (R3 $\rightarrow$ R6). The y-axis represents the Log CFU (Colony Forming Units), as the raw values obtained are at very high powers of 10.

In this section, we focus on the microbial composition of SHIME® of women of childbearing age. Starting with the analysis of total aerobic flora, we observed a bacterial count of approximately 8 Log10 CFU/mL in the different reactors during control period. However, no significant variation in the bacterial count was observed after exposure to CPF compared to control (Fig. 2 A). Similarly, total anaerobic flora didn't show significant bacterial count changes (Fig. 2 B). Subsequently, our analysis of the microbial composition at the phylum level revealed alterations in the concentrations of specific gut bacteria, after CPF exposure. We observed a significant increase of 35 % of *Clostridium spp* colony count in proximal ($p < 0.01$, vs CPF0) and transverse colon ($p < 0.001$, vs CPF0 and $p < 0.01$ vs CPF15) (Fig. 2 C). In the distal colon we detected a decrease of *Clostridium spp* after 15 days ($p < 0.01$, vs CPF0) that was reversed to a significant increase of approximately 40 % after 30 days ($p < 0.001$, vs CPF15). Additionally, our results showed a significant increase of *Enterococcus spp* post-30 days exposure in proximal colon ($p < 0.05$, vs CPF0 and vs CPF15) (Fig. 2 D). In contrast, the abundance of potentially beneficial bacteria, such as *Lactobacillus spp.*, significantly decreased after 15 days pesticide exposure the transverse ($p < 0.001$, vs CPF0) and distal colon after 15 ($p < 0.0001$, vs CPF0) and 30 days ($p < 0.001$, vs CPF0) (Fig. 2 F). Meanwhile, *Bifidobacterium spp.* exhibited a slight and

progressive, yet non-significant, decline in the ileum over the 30-day exposure period (Fig. 2 E). In the proximal colon, *Bifidobacterium spp.* decreased after 15 days but did not show a significant change after 30 days.

These results indicate that CPF exposure significantly modulated GM composition of women of reproductive age: CPF reduced the number of beneficial *Lactobacillus* and increased the number of potentially pathogenic phyla: *Clostridium spp.* and *Enterococcus spp.*

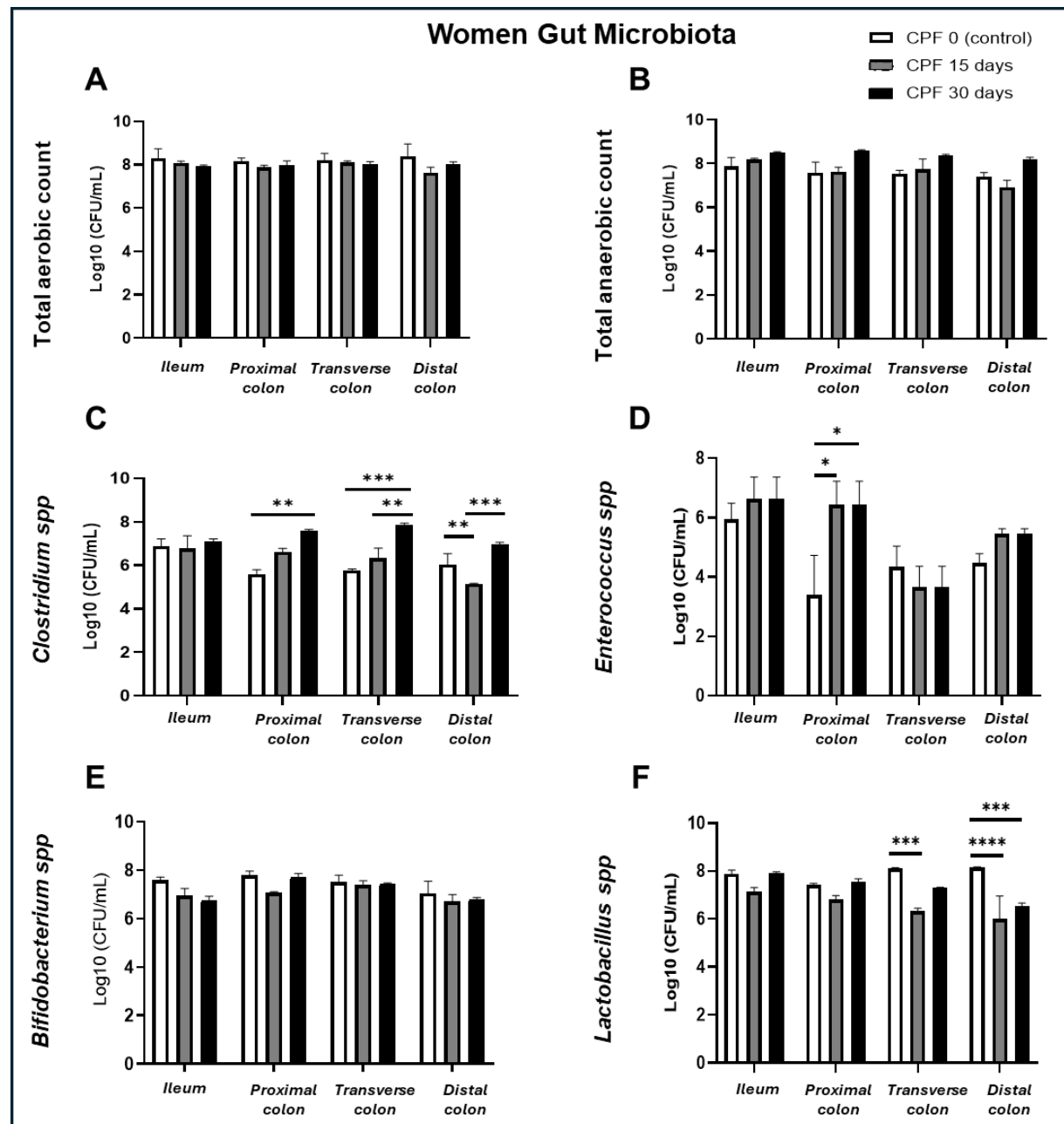


Fig. 1 Effect of 15 and 30 days (CPF15 and CPF30) of CPF exposure (1mg/day) on bacterial count (log CFU/mL) of total aerobic and anaerobic flora, *Clostridium spp.*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the ileum and colon reactors of the SHIME® of childbearing age female volunteers. Data is illustrated as mean $\pm$ SEM (n = 6-9) using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test.

Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. CPF0: Control; CPF15: 15 days of CPF; CPF30: 30 days of CPF.

3.4.2 CPF exposure of pregnant women gut microbiota

In a second stage, we focused on the microbial composition of SHIME® of pregnant women. Total aerobic flora results showed a significant increase after 15 days of CPF exposure in both proximal and distal colon ($p < 0.01$, vs CPF0) while no significant change in total anaerobic flora was detected (Fig. 3 A and B). Our phylum-level analysis revealed modifications in the concentrations of specific gut bacteria following CPF exposure. As in SHIME® of women of childbearing age, we found increased *Clostridium spp* count in both proximal and distal colon at the 30th day of exposure ($p < 0.05$, vs CPF0) (Fig. 3 C). Parallely, *Enterococcus spp* counts were more significantly increased post-30 days in all colon segments ($p < 0.001$ in PC; $p < 0.01$ in TC; $p < 0.0001$ in DC, vs CPF0) (Fig. 3 D). In contrast, *Bifidobacterium spp.*, significantly decreased after 30 days pesticide exposure in the transverse colon ($p < 0.05$, vs CPF0). *Lactobacillus spp* exhibited a significant decline in the ileum over the 30-day exposure period ($p < 0.05$, vs CPF0 and vs CPF15) and in distal colon ($p < 0.05$, vs CPF0) (Fig. 3 F).

Overall, CPF exposure significantly altered the gut microbiota in both pregnant and non-pregnant women, with notable increases in potentially pathogenic *Clostridium spp.* and *Enterococcus spp.*, and a reduction in beneficial *Lactobacillus spp.*; however, the changes were more pronounced in pregnant women, indicating a heightened sensitivity during pregnancy.

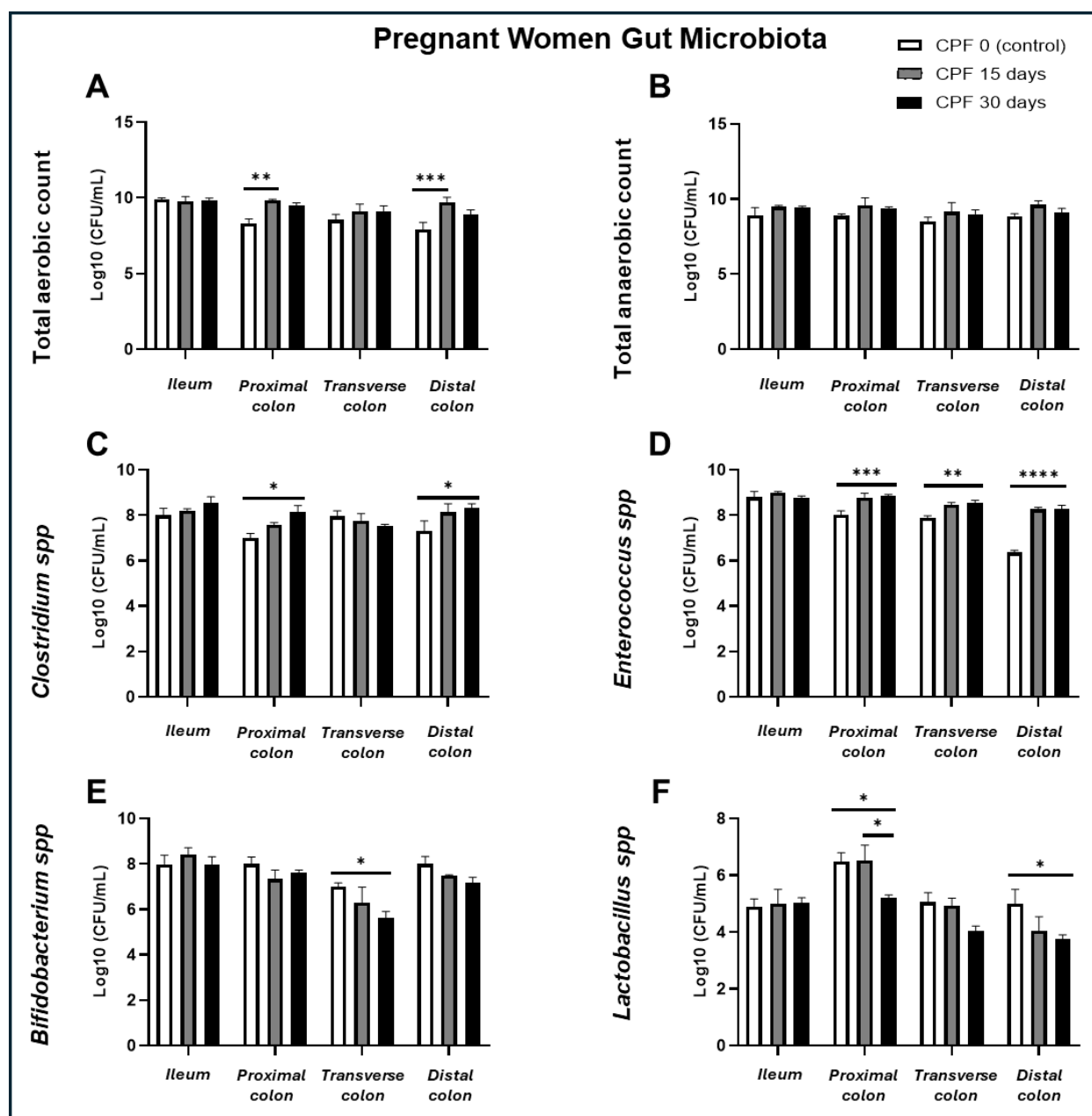


Fig. 2 Effect of 15 and 30 days (CPF15 and CPF30) of CPF exposure (1mg/day) on bacterial count (log CFU/mL) of total aerobic and anaerobic flora, *Clostridium spp.*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the ileum and colon reactors of the SHIME® of pregnant female volunteers. Data is illustrated as mean $\pm$ SEM (n = 6-9) using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. CPF0: Control; CPF15: 15 days of CPF; CPF30: 30 days of CPF

3.4.3 CPF and Inulin exposure of women gut microbiota

In a third stage, we focused on the effect of the combination of CPF and the prebiotic inulin on the microbial composition of SHIME® of women. No significant variation in the bacterial count total aerobic and anaerobic flora was observed after exposure to CPF and inulin compared to control (Fig. 4 A et B). With a closer look at bacterial phyla, we found a stable evolution of *Clostridium* (Fig. 4 C) and *Enterobacteria* (Fig. 4 D) and *Enterococcus* (data not shown). *Bifidobacterium* count slightly increased

in transverse colon after 15 days of CPF and inulin co-exposure, but this variation was not statistically significant. In contrast, *Lactobacillus* bacteria showed a significant increase in proximal colon after 15 days ($p < 0.05$, vs CPF0), that was maintained until the 30th day of co-exposure. Similarly, in transverse colon, *Lactobacillus* increased progressively until the 30th day of co-exposure ($p < 0.05$, vs CPF0).

In contrast to the significant alterations observed with CPF exposure alone, the combined exposure to CPF and inulin resulted in a remarkable stability across the majority of bacterial phyla. This suggests that inulin may have a protective effect, preventing the disruptive impact of CPF on the gut microbiota composition.

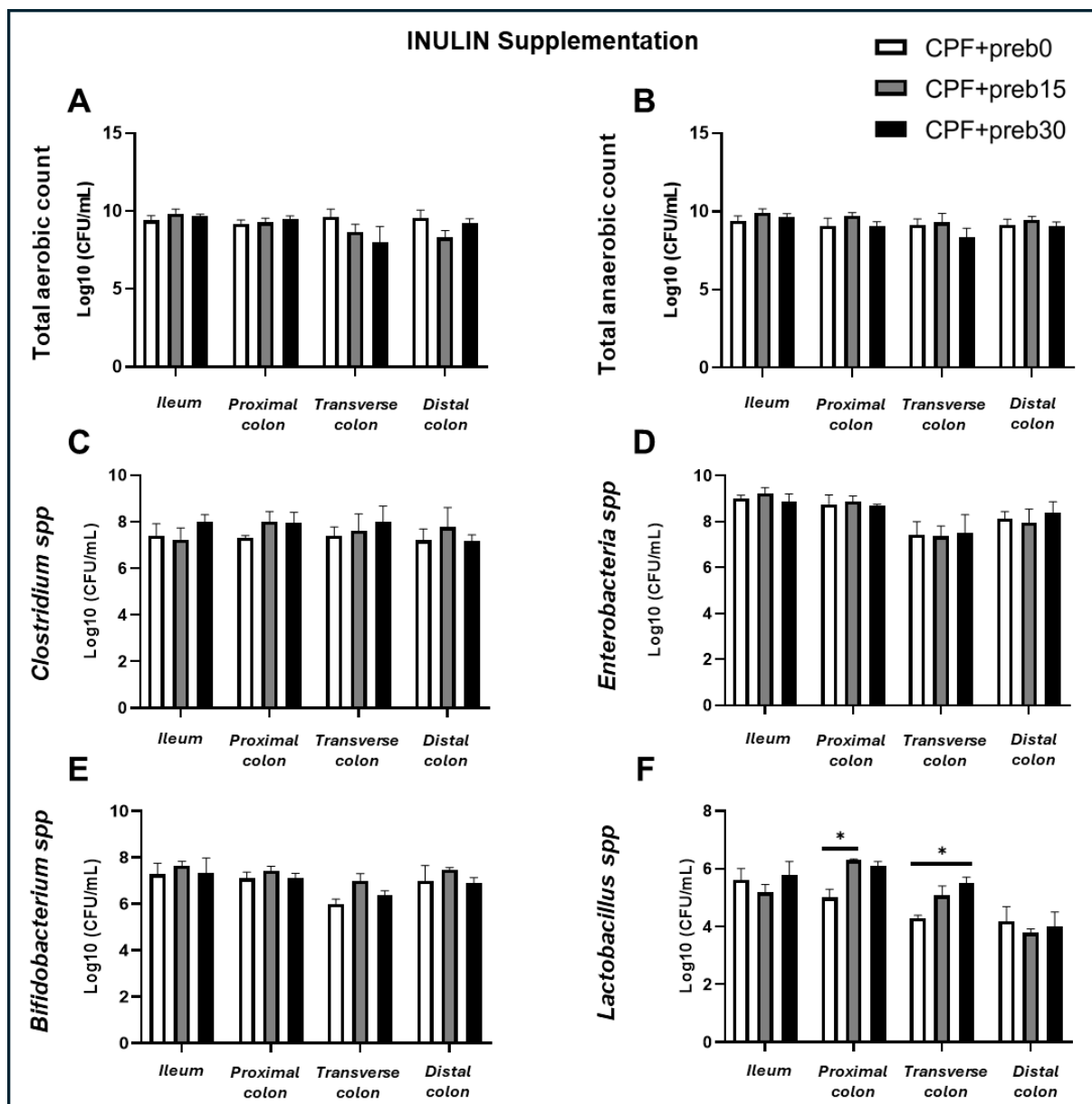


Fig. 3 Effect of 15 and 30 days (CPF+preb15 and CPF+preb30) of CPF exposure (1mg/day) and the prebiotic inulin (10 mg/day) on bacterial count (log CFU/mL) of total aerobes and anaerobes, *Clostridium* spp., *Enterobacteria*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in different colon reactors of the

SHIME®. Values are expressed as mean $\pm$ SEM using the nonparametric Kruskal-Wallis test. Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CPF+preb0: Control; CPF+preb15: 15 days of CPF and inulin; CPF+preb30: 30 days of CPF and inulin

3.5 Gut microbiota SCFAs analysis

In parallel with GM composition analysis, accurate quantification of SCFAs is essential as they are key indicators of gut microbial and metabolic activity. In the SHIME® model representing the GM of non-pregnant women, a significant increase of total SCFA (mol/L) was observed in the proximal colon ($p < 0.001$, vs control) (Fig. 4 B) after 30 days of CPF exposure but no impact on total SCFA was detected in ileum (Fig. 4 A), transverse (Fig. 4 C) and distal colon (Fig. 4 D). However, a significant decrease in propionate ratio (Fig. 4 *a.3, b.3, c.3, d.3*) was seen after 30 days of CPF exposure in the proximal ($p < 0.001$, vs control; $p < 0.0001$, vs CPF15), transverse ($p < 0.05$ vs control), and distal colon ($p < 0.05$ vs control), accompanied by an increase in butyrate in the proximal colon ($p < 0.0001$, vs CPF15 and vs CPF30), but a decrease in butyrate in the distal colon after 30 days ($p < 0.05$ vs control). In the distal colon, there was a tendency for the acetate ratio to increase from 65 to 80 (Fig. 4 *d.1*), although this was not significant due to the progressive increase between CPF0 (control), CPF15days, and CPF30days, to the expense of butyrate and propionate significant decrease.

In the SHIME model representing the GM of pregnant women, total SCFA increased in the proximal colon after 30 days of CPF exposure ($p < 0.01$, vs control). Additionally, a significant increase in total SCFA was detected in the transverse and distal colon after 15 and 30 days of CPF treatment. Regarding SCFA ratios, a 20% decrease in acetate (from 80 to 60) was observed after 15 days of CPF treatment in the distal colon ($p < 0.05$ vs control), accompanied by a 20% increase in propionate ($p < 0.001$, CPF15 vs control and CPF30 vs control). This increase in propionate was also significant in the ileum, proximal colon, and transverse colon after 15 days, and remained significant in the transverse and distal colon after 30 days. A 10% increase in butyrate (Fig. 4 *a.2, b.2, c.2, d.2*) was noted in the ileum (5% after 15 days of CPF and 5% after 30 days), while a 10% decrease in butyrate was observed in the proximal colon.

In the case of GM supplemented with inulin, changes in total SCFA were only detected in distal colon: significant increase after 15 days of exposure to CPF+preb ($p < 0.001$, vs control) that was restored to control levels after 30 days. However, an approximate 10% increase in butyrate was observed in the ileum after 15 and 30 days of exposure ($p < 0.001$, vs control), but a decrease in butyrate was noted in the proximal colon after 15 days of, and also in the transverse colon after 15 and 30 days to the favor of an increase in propionate after 30 days in the transverse and distal colon.

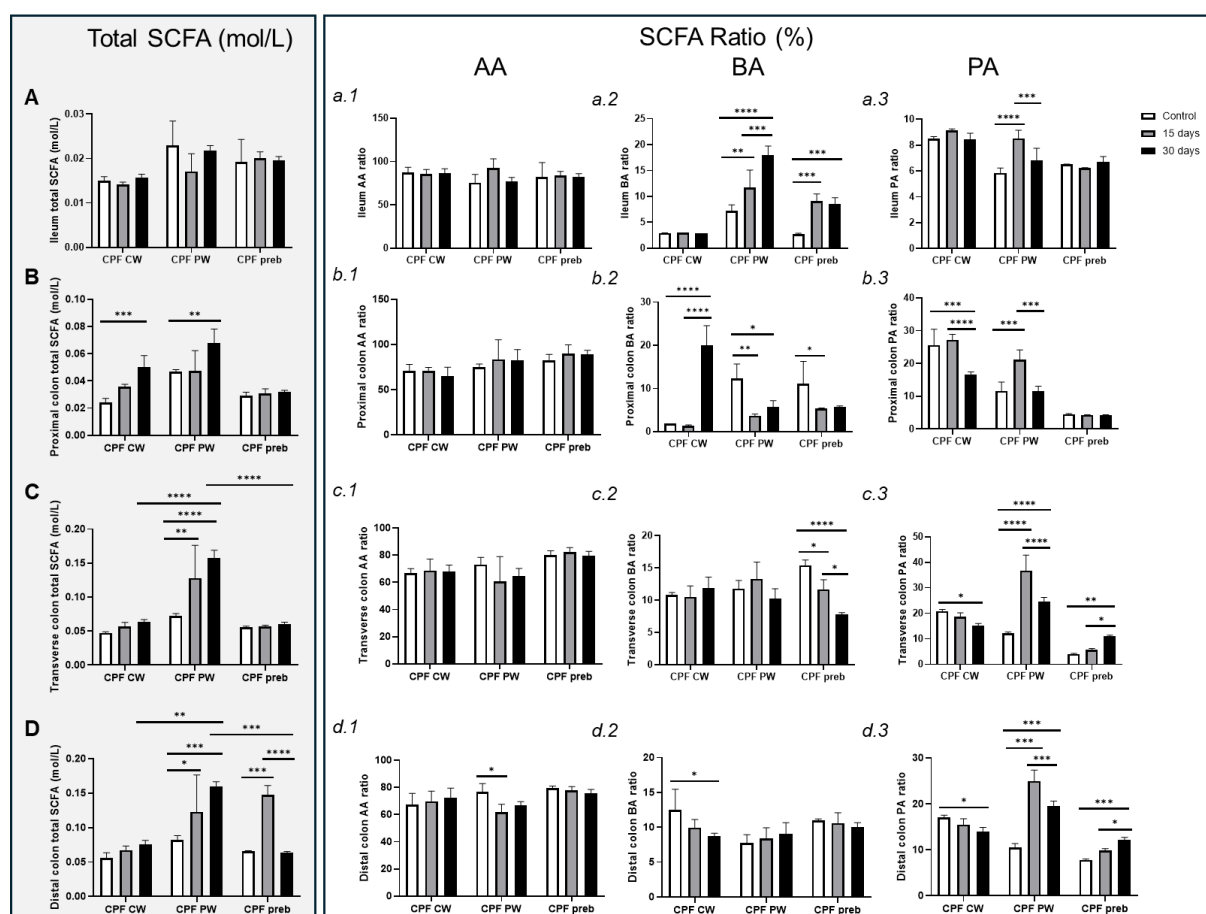


Fig. 4 Effect of 15 and 30 days to CPF in non-pregnant women (CPF CW) and pregnant women (CPF PW) and to CPF preb on the Total SCFA levels (A. Ileum B. Proximal colon C. Transverse colon and D. Distal colon) and ratio of acetate (AA column: *a.1*, *a.2*, *a.3* and *a.4* in the respective reactors), butyrate (BA column: *b.1*, *b.2*, *b.3* and *b.4*) and propionate (PA column: *c.1*, *c.2*, *c.3* and *c.4*). Values are expressed as mean $\pm$ SD using two-way ANOVA test. Significance * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.6 CPF assay in SHIME® reactors

The assay of CPF and its metabolites was conducted to assess their biotransformation by GM across SHIME® reactors, spanning from the stomach to the distal colon. It was crucial to ascertain the presence of CPF in donors' fecal samples prior to the control period and exposure. Our findings indicated an absence of CPF and its metabolites in the reactors before exposure in both SHIME® experiments: CPF non-pregnant women (Fig. 5A1 and A2), CPF pregnant women (Fig. 5B1 and B2) and CPF+prebiotic (Fig. 5C1 and C2). This implies that the fecal inoculum was devoid of CPF and its metabolites, ensuring that the observed effects on the GM were attributable solely to the CPF introduced into the stomach reactor (R1). Following the collection of all control sample replicates, CPF administration started, as evidenced by the increased CPF concentrations in reactor samples between the control and 30-day exposure period. The highest CPF concentration was observed in the stomach at day 10 of exposure in

the SHIME CPF experiments and at day 15 in the SHIME CPF+prebiotic. Post this peak, CPF concentrations began to decline progressively across all reactors. During this decline, minor increases were noted, corresponding to the daily addition of CPF. Notably, in the SHIME supplemented with the prebiotic, the decline in CPF concentration was more rapid, with lower detections in the colon reactors compared to SHIME CPF. Furthermore, the final CPF concentration was lower in the SHIME CPF+prebiotic than in SHIME CPF. Specific metabolites of CPF (CPF-oxon and 3,5,6- trichloro-2-pyridinol (TCP)) were not detected across reactors.

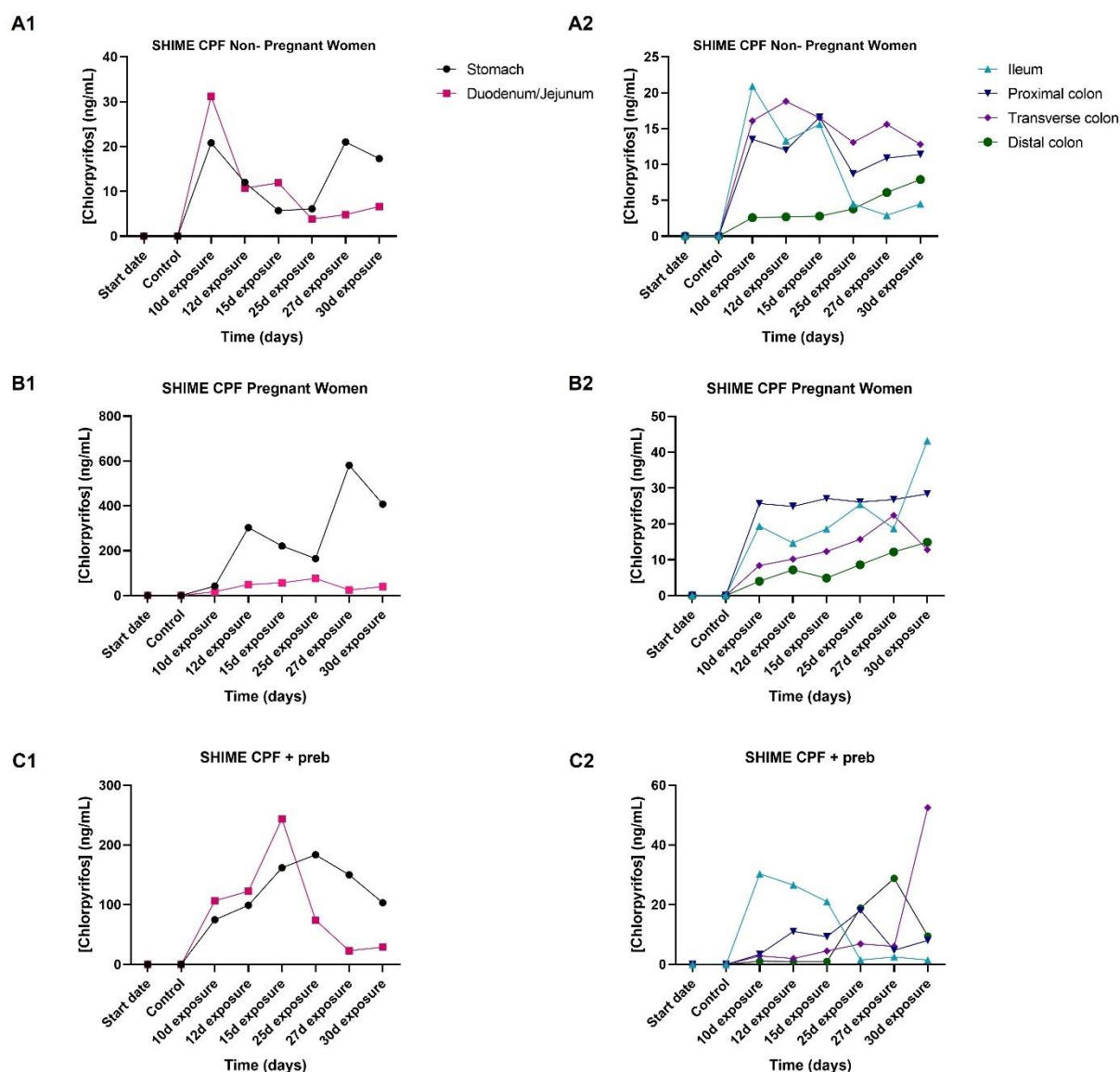


Fig. 5 Variation of CPF concentration in SHIME® reactors +from the start date (fecal inoculum before stabilization period) to 30 day of exposure to the CPF in non-pregnant women (A1 and A2), CPF in pregnant women (B1 and B2), and CPF+preb (C1 and C2)

3.7 Effect of CPF-treated women gut microbiota on bacterial translocation across IB and BBB models and permeability measurement

To assess the impact of GM exposure to CPF on IB integrity, we measured the permeability to FD4 (Pe FD4) in Caco-2 cells after a 4-hour exposure to both untreated SHIME® colon supernatants (control group) and CPF-exposed SHIME® colon supernatants.

The graph of intestinal permeability in the IB model reveals significant variations across different treatment groups (Fig 5.B, left graph). In the control group, the permeability remains low ($Pe < 0.25 \times 10^{-5}$ cm/min), indicating a stable and intact IB. After exposure to CPF (15 days)-treated SHIME® supernatants, no significant variation of Pe FD4 was detected. However, upon exposure to CPF (30 days)-treated SHIME® supernatants there is a marked increase in permeability, suggesting that CPF disrupts the IB function. Specifically, the permeability value rises from a baseline of approximately 0.13×10^{-5} cm/min in the control group to around 0.8×10^{-5} cm/min in the Caco-2 cells. In contrast, the cells exposed to CPF+inulin-treated SHIME® supernatants had permeability values similar to the control, suggesting that inulin maintains the integrity of the IB.

Immunofluorescence analysis of the tight junction protein ZO-1 confirmed these permeability results. In the control group, ZO-1 (green) was consistently localized along the Caco-2 cell membrane (Fig. 5C.a), indicating intact tight junctions. After exposure to CPF-treated SHIME® supernatants, ZO-1 staining became discontinuous and faded, consistent with the increased permeability and disruption of tight junctions. In contrast, ZO-1 staining remained intact in the CPF+inulin group, further supporting the protective role of inulin against CPF-induced tight junction disruption.

To assess the potential indirect effects of CPF on the BBB, endothelial cells were exposed to aliquots collected from the basolateral compartment of Caco-2 cells after 4 hours of SHIME® exposure, where CPF may have been metabolized. Despite the observed disruption in the IB, no significant changes in FD4 permeability were detected in the BBB endothelial cells after exposure to these basolateral aliquots (Fig. 5B, right graph), indicating that gut-derived factors did not compromise BBB integrity under these conditions.

In parallel, we assessed the possibility that the increased Pe FD4 in Caco-2 cells could lead to bacterial translocation from the apical to the basolateral compartments and into the endothelial cells of the BBB.

We first assessed bacterial translocation across Caco-2 cells exposed to CPF-treated SHIME® supernatants (from the distal colon or a mix of all colon segments). As shown in Fig. 5D, significant differences in bacterial translocation were observed among treatment groups, indicating disruption of intestinal barrier function. In the control group, the percentage of bacterial translocation remained low, confirming that exposure to non-treated SHIME® supernatants did not compromise IB integrity. However, exposure to CPF (30 days)-treated SHIME® supernatants led to a marked increase in translocation, with percentages rising from 0% in the control group to 30% in the CPF15 group and

87% in the CPF30 group (distal colon). Similarly, in Caco-2 cells exposed to colon mix SHIME® supernatants, translocation percentages increased from 0% in the control to 30% in CPF15 and 92% in CPF30. In contrast, inulin maintained gut barrier stability, with translocation percentages comparable to the control, ranging from 0% to 13% (distal colon) and 3% to 11% (colon mix). Next, we examined the hypothetical possibility that the increase in Pe FD4 in Caco-2 cells could affect bacterial translocation to the endothelial cells of the BBB. Importantly, no bacterial translocation was detected across the BBB, confirming the stability of BBB permeability after 4 hours of exposure to Caco-2 basolateral samples.

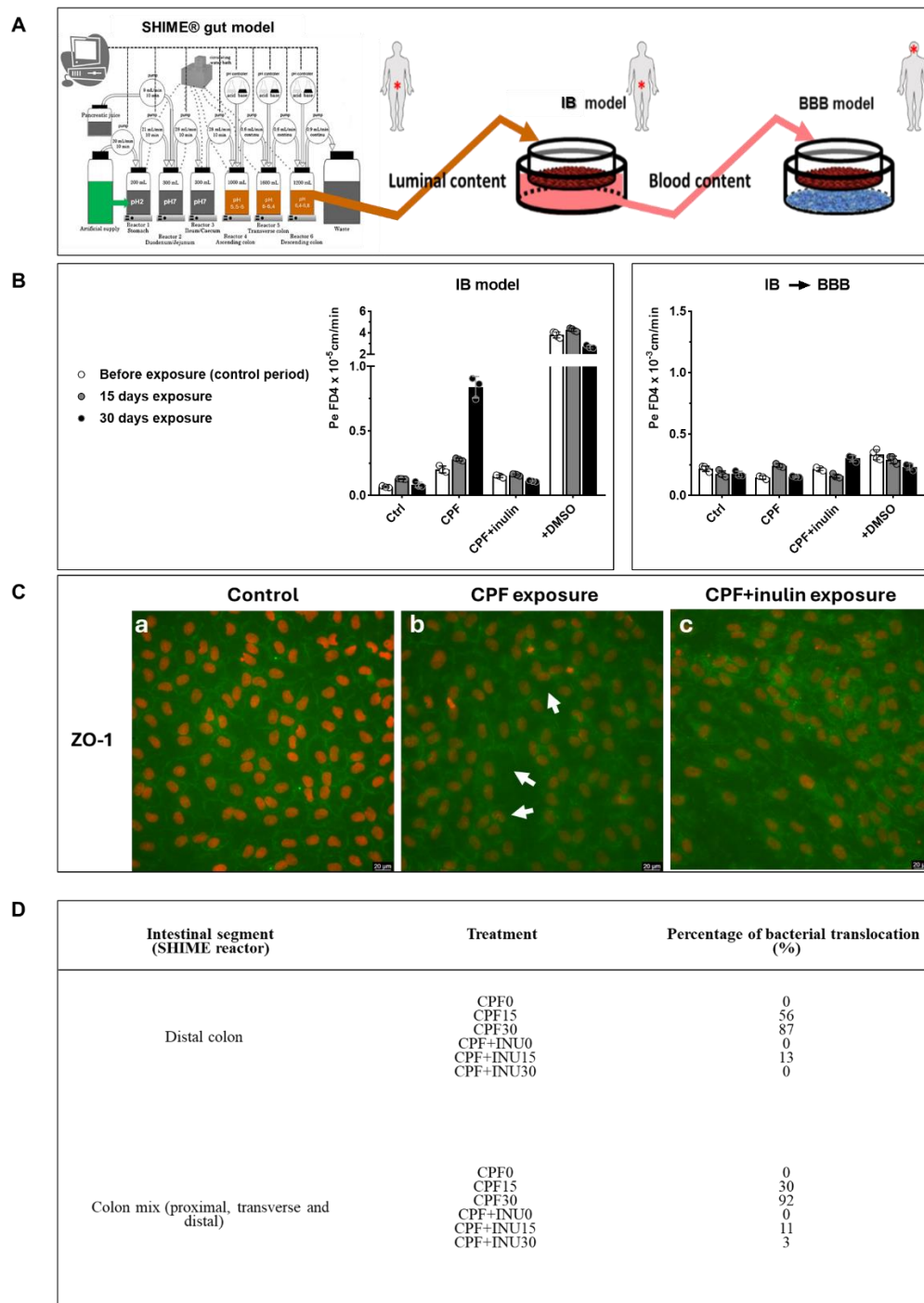


Fig. 6 Effect of 15 and 30 days (CPF15 and CPF30) of CPF exposure (1mg/day) $\pm$ inulin (10 mg/day) of GM on IB and BBB models. (A) Schematic representation of the combination of the three human in vitro models. (B) Permeability to non-permeant FD4 in both barriers IB and BBB models. (C) Immunostaining of Zonula Occludens 1 (ZO-1) (green color) of Caco-2 cells. Nuclei appear in red. Scale bar = 20 μ M. White arrows indicate discontinuous staining. (D) Bacterial translocation percentage of SHIME® total flora (of distal colon and colon mix of the three colon segments) across the IB (Caco-2 cells) at CPF0 (SHIME® samples collected before CPF exposure), CPF15 (SHIME® samples collected 15 days after CPF exposure) and CPF30 (SHIME® samples collected 30 days after CPF exposure).

4. Discussion

4.3 Impact of CPF on gut microbiota-BBB axis and prevention by inulin

The GM-BBB axis represents a complex and dynamic communication network that links the gut, the IB, and the brain. The GM plays a crucial role in maintaining intestinal homeostasis by regulating the permeability of the IB and modulating immune responses by producing metabolites (e.g. SCFAs). In turn, the IB serves as the first line of defense and acts as a crucial checkpoint against harmful pathogens and toxins, preventing bacterial translocation and ensuring that only essential nutrients and metabolites are absorbed into the bloodstream (Abou Diwan et al. 2023). The BBB is a selective barrier that shields the brain from harmful substances circulating in the blood and works in parallel with the IB to maintain central nervous system (CNS) homeostasis. Communication between the gut and the brain occurs through various pathways, including microbial metabolites, immune signaling, and systemic circulation. This gut-brain axis can be disrupted by factors such as altered microbiota composition, increased intestinal permeability, or BBB disruption. Dysregulation in this axis—whether through pesticide exposure, altered microbiota composition, increased intestinal permeability, or BBB disruption—can initiate a cascade of effects contributing to neuroinflammation and neurodegenerative diseases (Matsuzaki et al. 2023). While some studies have explored these dynamics, there is limited research specifically focusing on pregnant women. Therefore, it is crucial to investigate pesticide-induced dysbiosis during pregnancy and its effects on these vital body barriers. Our study specifically aims to evaluate the impact of CPF on the GM, IB, and BBB, and to analyze the potential protective effects of inulin during CPF exposure.

The primary objective of this study was to assess the consequences of pesticide-induced gut dysbiosis in the SHIME® model on IB and BBB permeability, utilizing a Caco-2 model (Sevin et al. 2013) and a BBB co-culture model of endothelial cells and human pericytes (Versele et al. 2022). Additionally, our research explores whether gut dysbiosis induced by CPF exposure can lead to bacterial translocation across the IB and BBB. Since bacterial translocation is a critical factor in the development of systemic inflammation and has been linked to various diseases, understanding this process is essential for evaluating the broader implications of pesticide exposure on human health.

In our previous studies, we utilized a rat model to investigate the effects of chronic CPF exposure on the maternal GM and the subsequent transgenerational impact on offspring, both in utero and postnatally (Djekkoun et al. 2022a, b; Abou Diwan et al. 2024). Recognizing the value of combining in vivo and in vitro approaches for a comprehensive understanding of pesticide toxicity, our current research employs in vitro models that more closely simulate human physiology. Specifically, we utilized the SHIME® model to replicate the human gut environment (Van de Wiele et al. 2015; Joly Condette et al. 2022), in conjunction with Caco-2 and BBB models. The novelty of our study lies in the integration of three highly standardized in vitro models, effectively mimicking the gut microbiota-BBB axis.

Gut microbiota composition Our study revealed that CPF exposure significantly disrupts GM composition, leading to an increase in pathogenic bacteria, particularly *Clostridium spp.* and *Enterococcus spp.*, while decreasing beneficial bacteria like *Lactobacillus spp.* Notably, co-exposure to the prebiotic inulin mitigated some of these adverse effects, restoring *Lactobacillus* populations and stabilizing pathogenic taxa. This indicates that inulin may play a protective role in maintaining GM balance and intestinal integrity, positioning it as a potential therapeutic intervention against pesticide-induced gut alterations. Notably, CPF exposure resulted in intestinal dysbiosis in both pregnant and non-pregnant women, with a more pronounced increase in *Clostridium spp.* and *Enterococcus spp.* observed in pregnant women, suggesting heightened sensitivity during this critical period. This underscores the need for further research into the implications of pesticide exposure on gut health, particularly in vulnerable populations like pregnant women.

Numerous studies have documented significant alterations in gut microbiota composition due to environmental exposures, particularly pesticides and other chemicals. For instance, a study by Mao and colleagues demonstrated that exposure to glyphosate, a widely used herbicide, resulted in a marked decrease in the diversity of gut microbial communities in rodent models (Mao et al. 2018a). This reduction in diversity was accompanied by an increase in pathogenic bacteria, highlighting the potential for environmental toxins to disrupt microbial balance.

Furthermore, research conducted by (Yang et al. 2019) reported similar findings in humans, where individuals exposed to high levels of organophosphate pesticides exhibited a significant shift in their GM profiles, characterized by increased abundance of opportunistic pathogens. These changes were correlated with markers of inflammation and gut permeability, suggesting that pesticide exposure can lead to dysbiosis, which may contribute to gastrointestinal and systemic health issues.

In the context of pregnancy, a study by Cameron et al. (2021) revealed that expectant mothers exposed to environmental pollutants had altered GM profiles compared to non-exposed counterparts. The study found an increase in harmful bacterial taxa and a decrease in beneficial genera such as *Bifidobacterium*, which play a crucial role in immune regulation and nutrient absorption. These changes during pregnancy could have significant implications for both maternal and fetal health, emphasizing the need for further investigation into how environmental exposures influence GM during this critical period.

Overall, these findings underscore the sensitivity of the GM to environmental influences and the potential consequences of such disruptions on health. Understanding these dynamics is essential for developing targeted interventions to preserve gut health, particularly in vulnerable populations, including pregnant women.

Barrier's permeability Our findings indicate that an increase in pathogenic bacteria due to CPF exposure can exacerbate IB inflammation and permeability, leading to bacterial translocation. Permeability assays with Caco-2 cells demonstrated that SHIME® supernatants from CPF-treated conditions compromised gut barrier integrity, evidenced by increased FD4 permeability. This suggests that CPF, upon metabolism by gut bacteria, weakens the IB.

Immunofluorescence analysis of ZO-1 further supported these permeability findings. Importantly, while CPF compromised the IB, it did not lead to bacterial translocation across endothelial cells, indicating the BBB's resilience under these conditions. The BBB is a highly selective and tightly regulated barrier, specifically designed to protect the brain from circulating harmful agents (Abbott et al. 2010). It is reinforced by more complex tight junctions and supported by glial cells, which may explain its increased resistance to CPF effects under our experimental conditions (Obermeier et al. 2013; Saunders et al. 2015). This observation reinforces the notion that the BBB remains unaffected by CPF exposure, highlighting its robust protective mechanisms. These results emphasize the role of the GM-BBB axis and the critical importance of maintaining IB integrity to prevent systemic exposure to harmful bacteria.

Notably, co-treatment with the prebiotic inulin reduced permeability and bacterial translocation, highlighting its protective effects against CPF-induced disruption of the gut barrier. Overall, these findings underscore inulin's therapeutic potential in preserving gut health in the presence of harmful substances like CPF.

SCFAs ratio alterations SCFAs are crucial metabolites produced by gut bacteria and play a vital role in maintaining gut health and barrier function. By measuring these metabolites, we aim to understand how CPF affects the metabolic activity of the GM and if supplementation with inulin can counteract these effects. Acetate is the most abundant SCFA (acetate 60: butyrate 20: propionate 20) and serves as a precursor for butyrate production (Dalile et al. 2019; Zhang et al. 2023b). A decrease in acetate with a corresponding increase in propionate might indicate a shift in microbial metabolism (Zhang et al. 2023b). Butyrate is crucial for colonocyte health and has strong anti-inflammatory and neuroprotective properties. A decrease in butyrate is related to the decrease of butyrate-producing bacteria (such as *Faecalibacterium prausnitzii*) and could compromise gut barrier function and increase inflammation (Li et al. 2024). The decrease in butyrate in the favor of propionate observed after CPF exposure in pregnant women is potentially negative as butyrate is essential for maintaining colonocyte barrier integrity. On the other hand, the decrease of propionate to the favor of butyrate that we observed in CPF treated non-pregnant GM in proximal colon is a potential negative effect for systemic metabolism. In fact, propionate has been shown to have beneficial effects, such as reducing cholesterol levels and acting as an anti-inflammatory agent. The decrease of propionate, as seen after CPF exposure in transverse colon of non-pregnant women, and the decrease of both (butyrate and propionate) in distal colon, compromising the gut barrier and metabolism, can explain the increased bacterial translocation risk we observed across the IB. These SCFA results confirmed our bacterial culture findings that showed increased potentially pathogenic bacteria (pathogenic

Clostridium and *Enterococcus*) to the expense of beneficial bacteria (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and beneficial *Clostridium* of cluster IV and XIV) (Guo et al. 2020).

In contrast, the increased butyrate ratio in ileum by inulin supplementation was not accompanied with propionate ratio decrease. In distal colon, inulin increased propionate ratio but butyrate didn't decrease which explains the beneficial effects of inulin we observed in bacterial culture (increase of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*) and the reduced risk of bacterial translocation (Djekkoun et al. 2022a; Qin et al. 2023; Abou Diwan et al. 2024). In addition, the time-dependent variations of butyrate and propionate confirm the link with a stable saccharolytic activity of the GM due to the prebiotic.

Our findings align with previous in vitro studies that have demonstrated the detrimental effects of CPF on GM and barrier integrity (Réquillé et al. 2018; Guibourdenche et al. 2021b; Joly Condette et al. 2022). For instance, a study reported similar gut dysbiosis by analyzing GM bacterial phyla (Zhao et al. 2016). The studies mentioned above have shown that CPF disrupts tight junction proteins, leading to increased intestinal permeability in Caco-2 cells after direct exposure to CPF or exposure to CPF-treated gut samples. This mirrors our results, where CPF exposure resulted in compromised gut barrier function.

Moreover, studies focusing on the role of the GM in regulating IB function have shown that dysbiosis can compromise barrier integrity (Di Vincenzo et al. 2023). These alterations in intestinal permeability are associated with several factors, including dietary components, microbial dysbiosis, and environmental toxins. This increased permeability is linked to systemic inflammation and metabolic disorders (Takiishi et al. 2017).

Similar studies have focused on the effect of pesticides similar to CPF, such as Diazinon, and demonstrated an impact on composition of bacterial populations (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, and *Clostridiaceae*) (Gao et al. 2017; Meng et al. 2020). Glyphosate has also been shown to alter GM balance by decreasing the relative abundance of *Firmicutes* and *Lactobacillus* and increasing *Fusobacteria* and proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Tang et al. 2020). Furthermore, studies found that exposure to pesticides can disrupt integrity in intestinal epithelial cells, resulting in heightened permeability and increased risk for inflammatory diseases. As an example, the fungicide Imazalil decreased *Firmicutes* population inducing gut dysbiosis and disrupted IB (Jin et al. 2016, 2021).

The protective effects of inulin observed in our study are also supported by previous research, which demonstrated that inulin supplementation can restore gut balance and IB function and reduce neuroinflammation (Hoffman et al. 2019; Uerlings et al. 2020). Moreover, a recent study demonstrated beneficial inulin effects on BBB permeability (Wang et al. 2023). These comparisons highlight the consistency of our findings with existing literature and underscore the potential of inulin as a therapeutic intervention. Overall, these findings underscore the sensitivity of the GM to environmental influences and the potential consequences of such disruptions on health. Understanding these dynamics is essential for developing targeted interventions to preserve gut health, particularly in vulnerable populations, including pregnant women.

While our findings align with many previous studies of CPF impacts on GM, the specific interaction between the GM, the IB, and the BBB remains an emerging field of research. Unlike many other studies that focused solely on the IB or GM, our study provides a novel exploration of the GM-BBB axis, emphasizing the importance of investigating pesticide effects across multiple biological barriers in vulnerable population (pregnant women). This comparison further highlights the necessity of combining in vitro models with in vivo studies to provide a more comprehensive understanding of the long-term effects of environmental contaminants like CPF on human health.

4.4 Strength and novelty of the in vitro approach to study the consequences of the GM dysbiosis on the human IB and BBB

In vivo and in vitro models are both essential tools in studying pesticide toxicity, each offering unique advantages. In vivo models, which involve studying pesticides in living organisms, provide a holistic understanding of how these chemicals interact with biological systems. However, these models are often expensive, time-consuming, and raise ethical concerns related to animal testing. In contrast, in vitro models offer a controlled environment where experimental conditions such as pH, temperature, and nutrient availability can be precisely manipulated, leading to higher reproducibility of results, which is crucial for validating scientific findings. These models are cost-effective, allow high-throughput screening and reduce the need for animal experimentation, addressing ethical issues.

Our mechanistic approach, using three standardized human in vitro models that mimic the GM-BBB axis, enables a detailed exploration of microbial interactions and enhances in vitro studies by incorporating key processes often missing in standard experiments. However, it is important to note that this model greatly simplifies the complexity of the GM-BBB axis, as it does not account for the full range of these physiological interactions that occur in a living organism.

4.5 Limits and perspectives

Future studies should prioritize investigating the underlying mechanisms behind CPF's selective effects on the IB compared to the BBB. Understanding how inulin provides its protective benefits—particularly optimal dosages and its efficacy when used in conjunction with other interventions—will be essential. Additionally, long-term studies are necessary to evaluate the chronic impacts of CPF exposure on both the IB and BBB, potentially extending exposure durations to 24 hours or several days to capture sustained effects. Furthermore, to better represent actual population exposures, future models could be designed to examine the combined effects of multiple pesticides, building on previous research that has explored the interactions between CPF and glyphosate in relation to brain health (Benbrook et al. 2021; Zhang et al. 2023). Such comprehensive investigations could significantly enhance our understanding of pesticide toxicity and its implications for human health.

To hypothetically improve our mechanistic approach and better mimic the gut-brain axis, we could explore the integration of more complex models.

Conclusion

In summary, our study aims to provide a comprehensive understanding of the impact of CPF on the GM, the IB, and the BBB. By using in vitro models and fecal samples from women of child-bearing age and pregnant women, we seek to elucidate the differential responses of the GM to CPF during pregnancy and the consequences on the IB and BBB permeability and bacterial translocation across these barriers. Our study highlighted the detrimental effects of CPF on GM and IB integrity, and the protective role of inulin. Our findings contribute to the growing body of knowledge on the health risks associated with pesticide exposure and highlight the importance of considering physiological states such as pregnancy in toxicological studies. Moreover, these findings underscore the importance of

maintaining a balanced GM and gut barrier integrity for overall health. Our results open avenues for further research to explore the mechanisms of the long-term impact of CPF exposure on the gut-brain axis and the potential of prebiotics like inulin in mitigating the adverse effects of environmental toxins.

References

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37:13–25
- Abou Diwan M, Djekkoun N, Marie-Christine B, et al (2024) Maternal exposure to pesticides induces perturbations in the gut microbiota and blood – brain barrier of dams and the progeny , prevented by a prebiotic. *Environ Sci Pollut Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34969-1>
- Abou Diwan M, Lahimer M, Bach V, et al (2023) Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota – Blood – Brain Barrier Axis : A Narrative Review
- Balaguer-Trias J, Deepika D, Schuhmacher M, Kumar V (2022) Impact of Contaminants on Microbiota: Linking the Gut–Brain Axis with Neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031368>
- Brousse F, Malonga G, Yang G, Sadeg N (2019) Assessment of Exposure to Organic and Inorganic Pollutants in Children ’ s Hair. *Int J Public Heal Res* 7:18–22
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, et al (2014) A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099733>
- Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, et al (2008) An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol Vitr* 22:799–811. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2007.12.016>
- Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K (2019) The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- Dehouck M -P, Méresse S, Delorme P, et al (1990) An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood–Brain Barrier In Vitro. *J Neurochem* 54:1798–1801. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1990.TB01236.X>
- Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, et al (2023) Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med.* <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
- Djekkoun N, Depeint F, Guibourdenche M, et al (2022a) Chronic Perigestational Exposure to Chlorpyrifos Induces Perturbations in Gut Bacteria and Glucose and Lipid Markers in Female

- Djekkoun N, Depeint F, Guibourdenche M, et al (2022b) Perigestational exposure of a combination of a high - fat diet and pesticide impacts the metabolic and microbiotic status of dams and pups ; a preventive strategy based on prebiotics. *Eur J Nutr*. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-03063-y>
- Doroszkievicz J, Groblewska M, Mroczko B (2021) The role of gut microbiota and gut–brain interplay in selected diseases of the central nervous system. *Int J Mol Sci* 22:.. <https://doi.org/10.3390/ijms221810028>
- Edwards SM, Cunningham SA, Dunlop AL, et al (2017) The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. *MCN, Am J Matern Nurs* 42:310–317. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000372>
- Fuhler GM (2020) The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 44–45:101671. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2020.101671>
- Galea I (2021) The blood – brain barrier in systemic infection and in fl ammation. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
- Gao B, Bian X, Chi L, et al (2017) Organophosphate Diazinon altered quorum sensing, cell motility, stress response, and carbohydrate metabolism of gut microbiome. *Toxicol Sci* 157:354–364. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx053>
- Guibourdenche M, Haug J, Chevalier N, et al (2021) Food Contaminants Effects on an In Vitro Model of Human Intestinal Epithelium. *Toxics* 2021, Vol 9, Page 135 9:135. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9060135>
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P (2020) Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *J Anim Sci Biotechnol* 11:1–10. <https://doi.org/10.1186/S40104-019-0402-1/FIGURES/2>
- Harishankar MK, Sasikala C, Ramya M (2013) Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *3 Biotech* 3:137–142. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0078-0>
- Heymans M, Figueiredo R, Dehouck L, et al (2020) Contribution of brain pericytes in blood-brain barrier formation and maintenance: A transcriptomic study of cocultured human endothelial cells derived from hematopoietic stem cells. *Fluids Barriers CNS* 17:1–28. <https://doi.org/10.1186/S12987-020-00208-1/FIGURES/7>
- Hoffman JD, Yanckello LM, Chlipala G, et al (2019) Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221828>
- Jin C, Yuan X, Wang C, et al (2021) Maternal exposure to imazalil disrupts intestinal barrier and bile acids enterohepatic circulation tightly related IL-22 expression in F0, F1 and F2 generations of

- mice. *J Hazard Mater* 403:123668. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123668>
- Jin C, Zeng Z, Fu Z, Jin Y (2016) Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice. *Chemosphere* 160:349–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.105>
- Joly Condette C, Djekkoun N, Reygnier J, et al (2022) Effect of daily co-exposure to inulin and chlorpyrifos on selected microbiota endpoints in the SHIME® model. *Environ Pollut* 302:118961. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.118961>
- Joly Condette C, Elion Dzon B, Hamdad F, et al (2016) Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract of chlorpyrifos-exposed rats. *Gut Pathog* 8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0129-x>
- Lahimer M, Djekkoun N, Tricotteaux-Zarqaoui S, et al (2023) Impact of Perinatal Coexposure to Chlorpyrifos and a High-Fat Diet on Kisspeptin and GnRHR Presence and Reproductive Organs. *Toxics* 2023, Vol 11, Page 789 11:789. <https://doi.org/10.3390/TOXICS11090789>
- Lecerf JM, Dépeint F, Clerc E, et al (2012) Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. *Br J Nutr* 108:1847–1858. <https://doi.org/10.1017/S0007114511007252>
- Li Y, Liu A, Chen K, et al (2024) Sodium butyrate alleviates lead-induced neuroinflammation and improves cognitive and memory impairment through the ACSS2/H3K9ac/BDNF pathway. *Environ Int* 184:108479. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2024.108479>
- Linares R, Francés R, Gutiérrez A, Juanola O (2021) Bacterial Translocation as Inflammatory Driver in Crohn's Disease. *Front Cell Dev Biol* 9:703310. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.703310/BIBTEX>
- Mao Q, Manservigi F, Panzacchi S, et al (2018) The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on the microbiome. *Environ Heal*. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0394-x>
- Matsuzaki R, Gunnigle E, Geissen V, et al (2023) Pesticide exposure and the microbiota-gut-brain axis. *ISME J* 17:1153–1166. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01450-9>
- Menaceur C, Hachani J, Dib S, et al (2023) Highlighting In Vitro the Role of Brain-like Endothelial Cells on the Maturation and Metabolism of Brain Pericytes by SWATH Proteomics. *Cells* 12:1010. <https://doi.org/10.3390/CELLS12071010/S1>
- Meng Z, Liu L, Yan S, et al (2020) Gut microbiota: a key factor in the host health effects induced by pesticide exposure. *J Agric Food Chem*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04678>
- Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK (2021) The gut microbiota–brain axis in behaviour and

- brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 19:241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Nagpal R, Yadav H (2017) Bacterial translocation from the gut to the distant organs: An overview. *Ann Nutr Metab* 71:11–16. <https://doi.org/10.1159/000479918>
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19:1584–1596. <https://doi.org/10.1038/NM.3407>
- Qin YQ, Wang LY, Yang XY, et al (2023) Inulin: properties and health benefits. *Food Funct* 14:2948–2968. <https://doi.org/10.1039/D2FO01096H>
- Réquilé M, González Alvarez DO, Delanaud S, et al (2018) Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. *Environ Sci Pollut Res* 25:22529–22540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2332-4>
- Reygner J, Condette CJ, Bruneau A, et al (2016a) Changes in composition and function of human intestinal microbiota exposed to chlorpyrifos in oil as assessed by the SHIME® model. *Int J Environ Res Public Health* 13:. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111088>
- Reygner J, Lichtenberger L, Elmhiri G, et al (2016b) Inulin supplementation lowered the metabolic defects of prolonged exposure to chlorpyrifos from gestation to young adult stage in offspring rats. *PLoS One* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164614>
- Rizzi E, Deligne C, Dehouck L, et al (2021) A Triple Culture Cell System Modeling the Human Blood-Brain Barrier. *J Vis Exp* 2021:1–15. <https://doi.org/10.3791/63134>
- Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F (2020) The Gut-Brain Axis : How Microbiota and Host Inflammasome Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol* 11:1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson’s Disease. *Cell* 167:1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.018>
- Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgård K, Habgood MD (2015) Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci* 9:. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00385>
- Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da Costa A, et al (2013) Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:334–339. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.07.004>
- Sevin E, Dehouck L, Versele R, et al (2019) A Miniaturized Pump Out Method for Characterizing Molecule Interaction with ABC Transporters. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 5529 20:5529. <https://doi.org/10.3390/IJMS20225529>

- Sheng W, Ji G, Zhang L (2023) Immunomodulatory effects of inulin and its intestinal metabolites. *Front Immunol* 14:1224092. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1224092/BIBTEX>
- Shimizu F, Sano Y, Abe M aki, et al (2011) Peripheral nerve pericytes modify the blood–nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 226:255–266. <https://doi.org/10.1002/JCP.22337>
- Ta CA, Zee JA, Desrosiers T, et al (1999) Binding capacity of various fibre to pesticide residues under simulated gastrointestinal conditions. *Food Chem Toxicol* 37:1147–1151. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00110-6)
- Takiishi T, Ideli C, Fenero M, et al (2017) Intestinal barrier and gut microbiota : Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 5:1–12. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>
- Tang Q, Tang J, Ren X, Li C (2020) Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ Pollut* 261:114129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>
- Uerlings J, Schroyen M, Willems E, et al (2020) Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells. *J Funct Foods* 67:103855. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103855>
- Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, et al (2015) The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Impact Food Bioact Heal Vitr Ex Vivo Model* 305–317. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_27
- Versele R, Sevin E, Gosselet F, et al (2022) TNF- α and IL-1 β Modulate Blood-Brain Barrier Permeability and Decrease Amyloid- β Peptide Efflux in a Human Blood-Brain Barrier Model
- Wang L, Wang Z, Lan Y, et al (2023) Inulin Attenuates Blood-Brain Barrier Permeability and Alleviates Behavioral Disorders by Modulating the TLR4/MyD88/NF- κ B Pathway in Mice with Chronic Stress. *J Agric Food Chem* 71:13325–13337. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C03568/ASSET/IMAGES/LARGE/JF3C03568_0007
- Wright RO (2017) Environment , susceptibility windows , development , and child health. *Curr Opin Pediatr* 211–217. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000465>
- Yang F, Li J, Pang G, et al (2019) Effects of diethyl phosphate, a non-specific metabolite of organophosphorus pesticides, on serum lipid, hormones, inflammation, and gut microbiota. *Molecules* 24:21–23. <https://doi.org/10.3390/molecules24102003>
- Zhang D, Jian YP, Zhang YN, et al (2023) Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Commun Signal* 2023 211 21:1–20. <https://doi.org/10.1186/S12964-023-01219-9>

Zhao Y, Zhang Y, Wang G, et al (2016) Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere* 153:287–293.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.055>

Ethics declarations

Ethical approval

The study protocol was approved by the Ethical committee for non-interventional research (CERNI) of Picardy Jules Verne University (Evaluation number 2023-07-5/2023-27).

Consent to participate

Participation in this study was entirely voluntary, and participants could withdraw at any time without any penalty. Participants were given a detailed explanation of the study's purpose, procedures, potential risks, and benefits. Confidentiality of the participants' data was maintained throughout the study, since the protocol ensures that the processed data is anonymous. It does not allow for the identification of individuals, even indirectly, in any way; therefore, it is not considered personal data, and there is no correspondence table linking each person's identity to a random number referring to a series of individual data.

Consent to publish

Not applicable.

Author Contributions

Conceptualization, P.C. and H.K-C; methodology, P.C., H.K-C., S.D, E.S; software, M.AD, S.D. and E.S; validation, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; formal analysis, M.AD, J.P, S.D., E.S, P.C. and H.K-C; investigation, M.AD, E.S, P.C. and H.K-C; resources, F.G and V.B.; experiment, M.AD, A.H, J.P, S.D, E.S, A.C and L.R; data curation, M.AD, E.S, F.D, L.R; writing—original draft preparation, M.AD, J.P, E.S, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; writing—review and editing, M.AD, E.S, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; visualization, M.AD, E.S, H.O-A, P.C. and H.K-C; supervision, P.C., H.K-C, F.G and V.B.; project administration, P.C. and H.K-C; funding acquisition, P.C. and H.K-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received funding from the French State and the Hauts-de-France Region as part of CPER MOSOPS 2021-2027 project. Maria Abou Diwan received a doctoral fellowship from the 'Conseil régional du Nord-Pas-de-Calais' (50%), Picardy University (25%), and the Artois University (25%). The animal experiment was supported by the Ministry of Higher Education, Research and Innovation and National Institutes of Health and Hauts-de-France region.

Data availability Data is available on demand by email to the corresponding author.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Acknowledgements

The authors extend their gratitude to the gynecologist Dr. Arthur Foulon at the University Hospital of Amiens for identifying suitable participants and providing fecal samples. Our appreciation goes to all women volunteers who

donated fecal samples for research. We also thank members of the research management team of Picardy Jules Verne University for their assistance with the ethics approval application for this study. We thank IMITOX laboratory, especially Dr. Nouredine Sadeg, Dr. Florent Brousse and Dr. Gilles Malonga for pesticides metabolites analysis. We finally thank Pr. Fumitaka Shimizu and Pr. Takashi Kanda from the Department of Neurology and Clinical Neuroscience of Yamaguchi University in Japan for the human brain pericytes.

C. Résultats complémentaires

1. Analyse microbiologique par q PCR

Certaines espèces bactériennes n'étant pas cultivables, nous avons réalisé une quantification relative de genres et d'espèces bactériennes par q PCR après extraction de l'ADN.

Après l'analyse microbiologique par q PCR, les résultats indiquent si l'exposition à court et/ou à long terme au CPF impacte le MI des femmes en âge de procréer/femmes enceintes. Nos résultats sont représentés sous forme de diagrammes en barres, afin de faciliter la comparaison et de mieux mettre en évidence les résultats significatifs. L'axe des x représente les différents genres ou espèces bactériennes analysées avec une échelle de temps (avec des barres assignées à chaque jour : CPF 0 (contrôle), CPF 15 pour l'exposition à court terme au cocktail de pesticides et CPF 30 pour l'exposition (mais aussi la supplémentation en inuline CPF+preb) à long terme. L'axe des y représente le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (moyenne $\pm$ écart-type).

Nous avons représenté dans la Fig. 22 les résultats ayant montré un effet significatif. Les résultats du CPF chez la femme enceinte (Fig. 22 B) et non enceinte (Fig. 22 A) sont ceux dans le colon descendant (F6). Néanmoins, les résultats bénéfiques et significatifs de l'inuline ont été observés dans l'iléon (Fig. 22 C) et le colon transverse (Fig. 22 D).

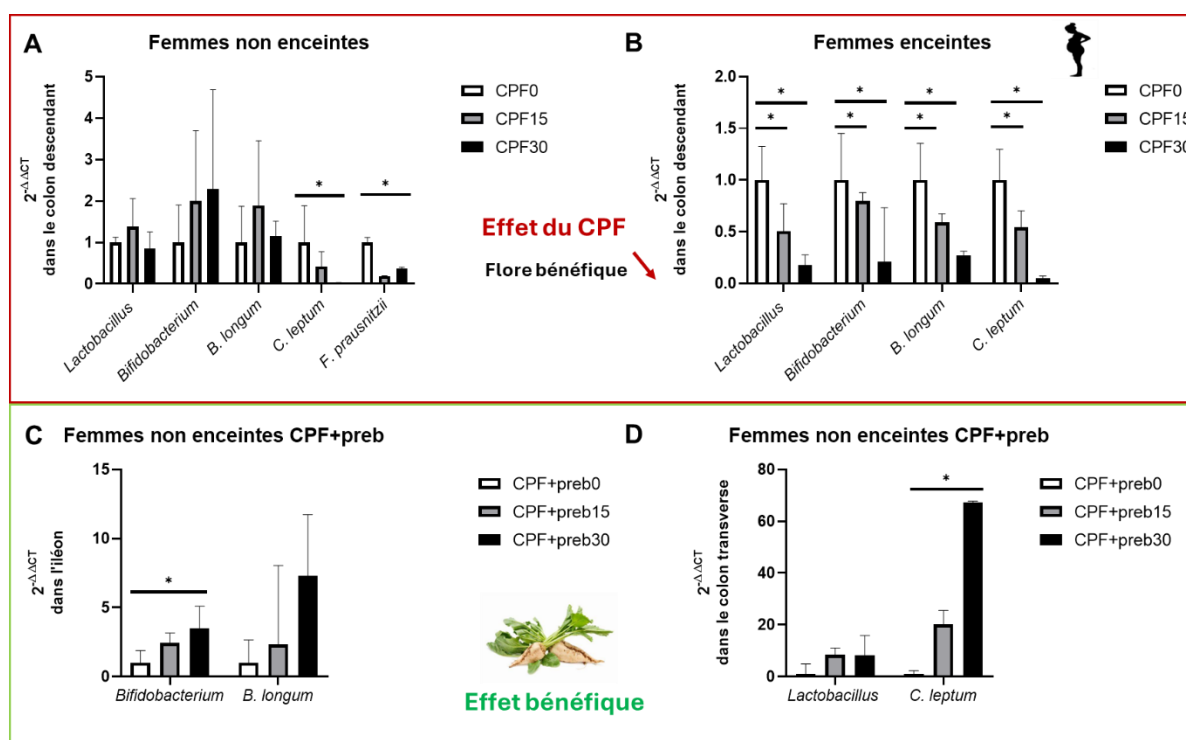


Figure 22: Résultats de l'étude par q PCR du CPF et de la supplémentation en inuline sur le MI de femmes enceintes et non enceintes

Les résultats ont montré d'une part que l'exposition du MI de la femme non enceinte induit une diminution significative de *C.leptum* et *F. prausnitzii* ($p < 0,05$ vs Pest0) après 30 jours d'exposition sans avoir un effet sur les genres *Lactobacillus* et *Bifidobactéries* dans le F6. Cependant, le CPF induit une diminution significative de toutes les bactéries bénéfiques *Lactobacillus*, *Bifidobactéries*, *B. longum* et *C. leptum* du MI des femmes enceintes dans le F6.

D'autre part, contrairement au CPF, l'inuline a induit une augmentation des *Bifidobactéries* ($p < 0,05$ vs Pest+preb0) et cela a lieu dans le F3 après 30 jours d'exposition, ses effets bénéfiques étant plus observés dans le F3 et F5 que dans le F6. De plus, dans le F5, l'inuline a significativement augmenté *C. leptum* après 30 jours d'exposition ($p < 0,05$ vs Pest+preb0).

Les résultats montrent donc une diminution de la flore bénéfique par le CPF qui semble plus probante chez la femme enceinte mais une augmentation par l'inuline. L'effet protecteur de l'inuline diminue voire neutralise ainsi les effets de CPF. L'espèce *C. leptum* semble être la cible commune entre ces deux traitements mais chacun induisant un effet différent sur celle-ci.

Ces résultats confirment ceux de la culture bactérienne et apportent plus de détails quant à certaines espèces bactériennes bénéfiques que nous n'avons pas cultivées comme *C. leptum* et *B. longum*. De même, ces résultats corroborent avec nos résultats de métabolites bactériens. Prenons comme exemple, la diminution des bactéries productrices de butyrate comme *F. prausnitzii* que nous avons pu analyser jusqu'à présent chez la femme non enceinte. Sa diminution est en concordance avec la diminution du butyrate observée dans le colon descendant ([article des résultats in vitro](#)).

De plus, ces résultats mettent en lumière la sensibilité et la vulnérabilité de la femme enceinte face aux contaminants alimentaires et la nécessité d'inclure les fibres alimentaires prébiotiques dans son régime alimentaire afin de contrer les effets de ces xénobiotiques toxiques.

Ces résultats seront complétés après notre analyse du reste des souches bactériennes dans les trois différents SHIME.

2. Etude de l'effet d'un cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur le MI de femmes enceintes et non enceintes par culture bactérienne

Après l'analyse microbiologique des colonies isolées sur milieu de culture, les résultats indiquent si l'exposition à court et/ou à long terme au cocktail de pesticides impacte le MI des femmes en âge de procréer/femmes enceintes. Nos résultats sont représentés sous forme de diagrammes en barres, afin de faciliter la comparaison et de mieux mettre en évidence les résultats significatifs. L'axe des x représente les différents réacteurs avec une échelle de temps (avec des barres assignées à chaque jour : Pest 0 (contrôle), Pest 15 pour l'exposition à court terme au cocktail de pesticides et Pest 30 pour l'exposition à long terme pour les différents fermenteurs (F3 → F6). L'axe des y représente le Log UFC (Unités Formant Colonie), car les valeurs brutes obtenues sont des puissances très élevées de 10.

Chez la femme non enceinte

Dans un premier temps, nous nous concentrons sur la composition microbienne du SHIME® des femmes en âge de procréer. En commençant par l'analyse de la flore aérobie totale, nous avons observé un nombre de bactéries d'environ 8 Log₁₀ UFC/mL dans les différents réacteurs pendant la période de contrôle. Cependant, aucune variation significative du nombre de bactéries n'a été observée après l'exposition au cocktail par rapport au contrôle (Fig. 23). De même, la flore anaérobie totale n'a pas montré de changements significatifs du nombre de bactéries. En revanche, la supplémentation en inuline a induit une augmentation significative de la flore totale aérobie après 30 jours d'exposition.

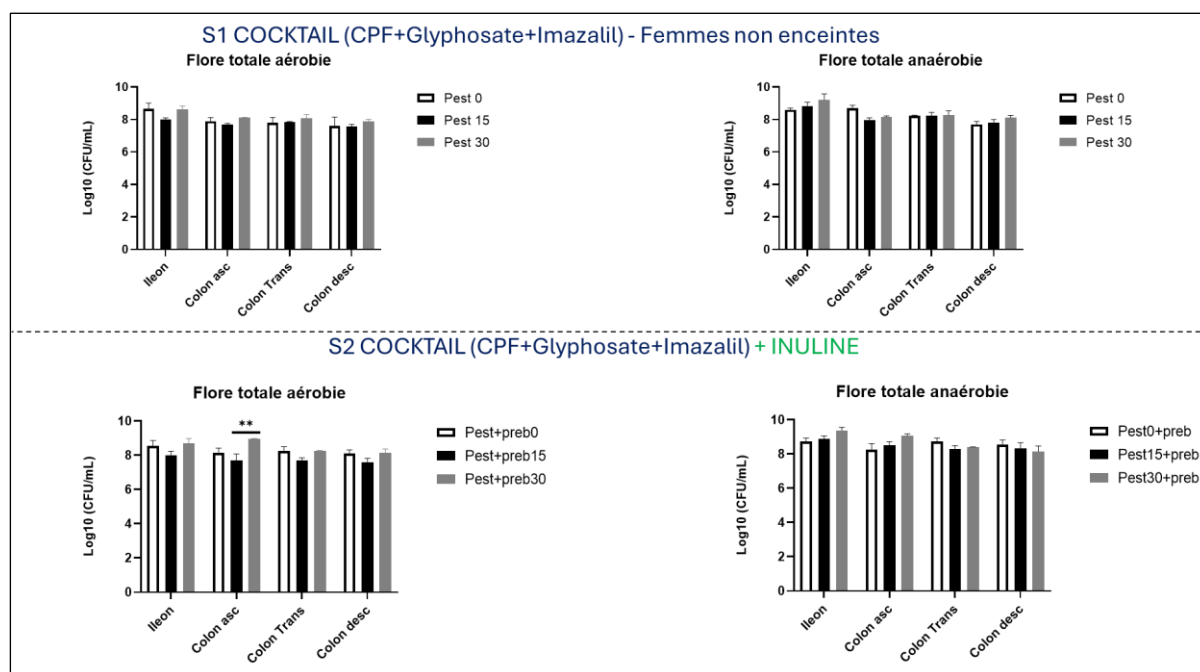


Figure 23: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore totale du MI de femmes non enceintes

Ensuite, notre analyse de la composition microbienne au niveau de la flore potentiellement pathogène n'a pas montré de variations significatives liées à l'exposition au cocktail (Fig. 24). Cependant, la

supplémentation en inuline a induit une diminution significative des bactéries appartenant au genre *Clostridium spp* après 15 et 30 jours d'exposition dans le F4 (colon ascendant) ($p < 0,05$ Pest 15 vs Pest0 ; $p < 0,001$ Pest 30 vs Pest0) et le F6 (colon descendant) ($p < 0,01$ Pest 15 vs Pest0 ; $p < 0,001$ Pest 30 vs Pest0) ; et après 30 jours ($p < 0,001$) dans le F5 (colon transverse). De même, l'inuline a diminué significativement les *Entérobactéries* 15 jours après l'exposition ($p < 0,05$).

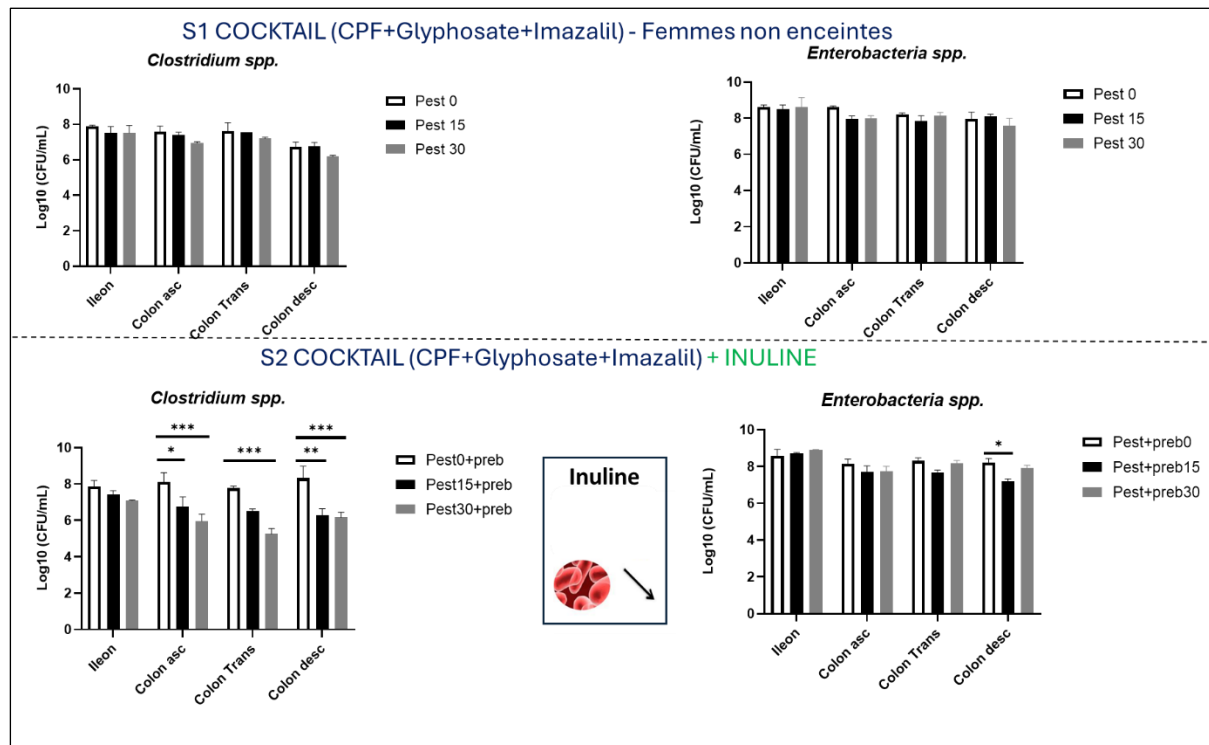


Figure 24: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore potentiellement pathogène du MI de femmes non enceintes

Concernant la flore bénéfique, nous avons observé une diminution significative des *Bifidobactéries* dans le F3 (l'iléon) après 15 jours d'exposition au cocktail ($p < 0,05$ vs Pest0), qui se sont rééquilibrées après 30 jours (Fig. 25). Cette diminution de bactéries bénéfiques n'a pas été observée à la suite de la supplémentation en inuline. Au contraire, l'inuline a induit une augmentation significative des bactéries bénéfiques, notamment les *Lactobacilles* dans le colon ascendant après 30 jours d'exposition ($p < 0,05$ vs Pest0+preb), qui pourrait expliquer l'augmentation significative de la flore totale observée dans ce fermenteur et qui souligne les effets bénéfiques de l'inuline même en présence de 3 pesticides.

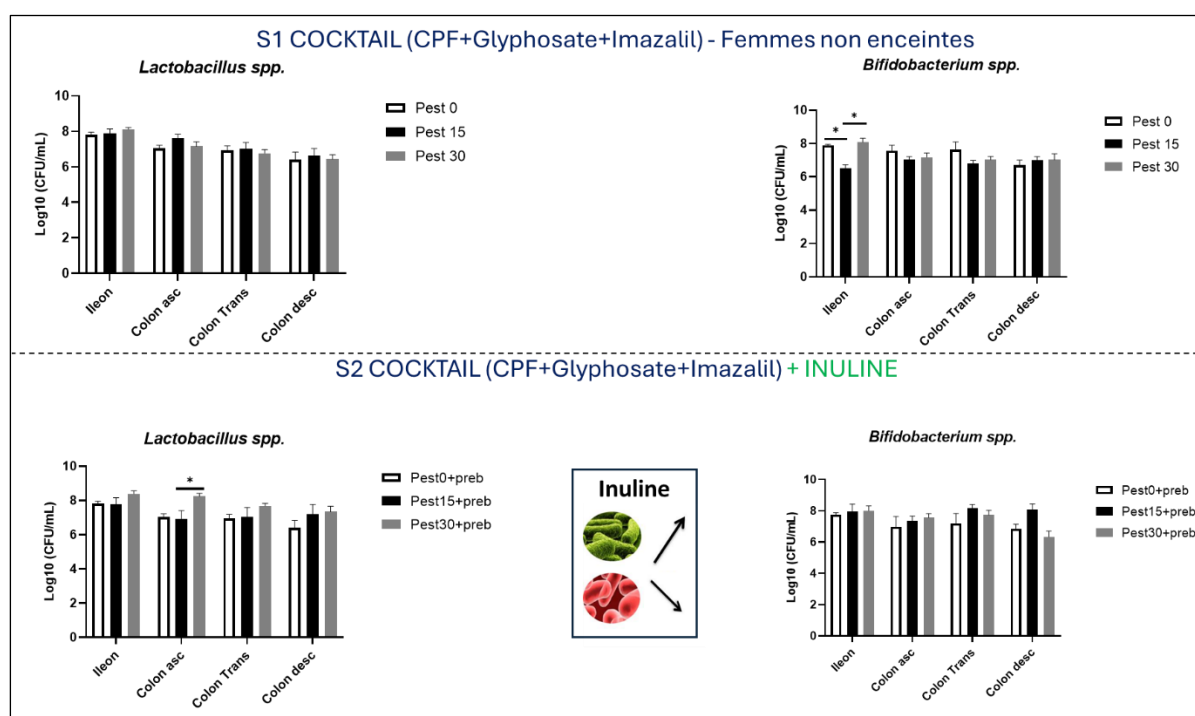


Figure 25: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore bénéfique du MI de femmes non enceintes

Chez la femme enceinte

L'analyse de la flore totale, a révélé un nombre de bactéries de départ d'environ 10 Log10 UFC/mL dans les différents réacteurs pendant la période de contrôle, valeur supérieure à celle observée chez la femme non enceinte (**Fig. 26**). Une augmentation significative de la flore totale aérobie a été observée dans le F6 après 30 jours d'exposition au cocktail ($p < 0,001$ vs Pest0 ; $p < 0,05$ vs Pest15). L'inuline semble induire l'effet contraire : une diminution significative de la flore totale aérobie après 30 jours ($p < 0,01$ vs Pest15) dans le F6 et une augmentation significative de la flore totale anaérobie dans le F4.

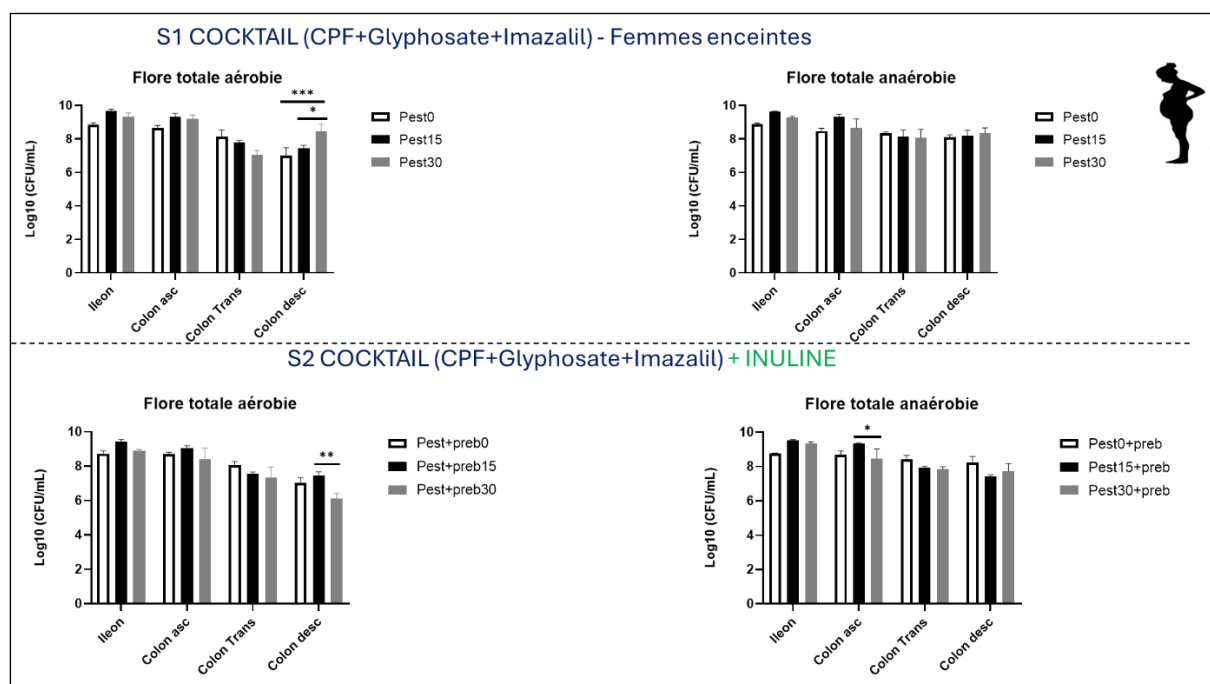


Figure 26: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore potentiellement pathogène du MI chez les femmes enceintes

L'analyse des bactéries appartenant à la flore potentiellement pathogènes, n'a pas révélé un effet significative du cocktail sur les *Clostridium* ni les *Entérobactéries*. Cependant, l'inuline diminue significativement les *Clostridium* dans le F6, après 15 jours d'exposition ($p < 0,05$ vs Pest0) (Fig. 27).

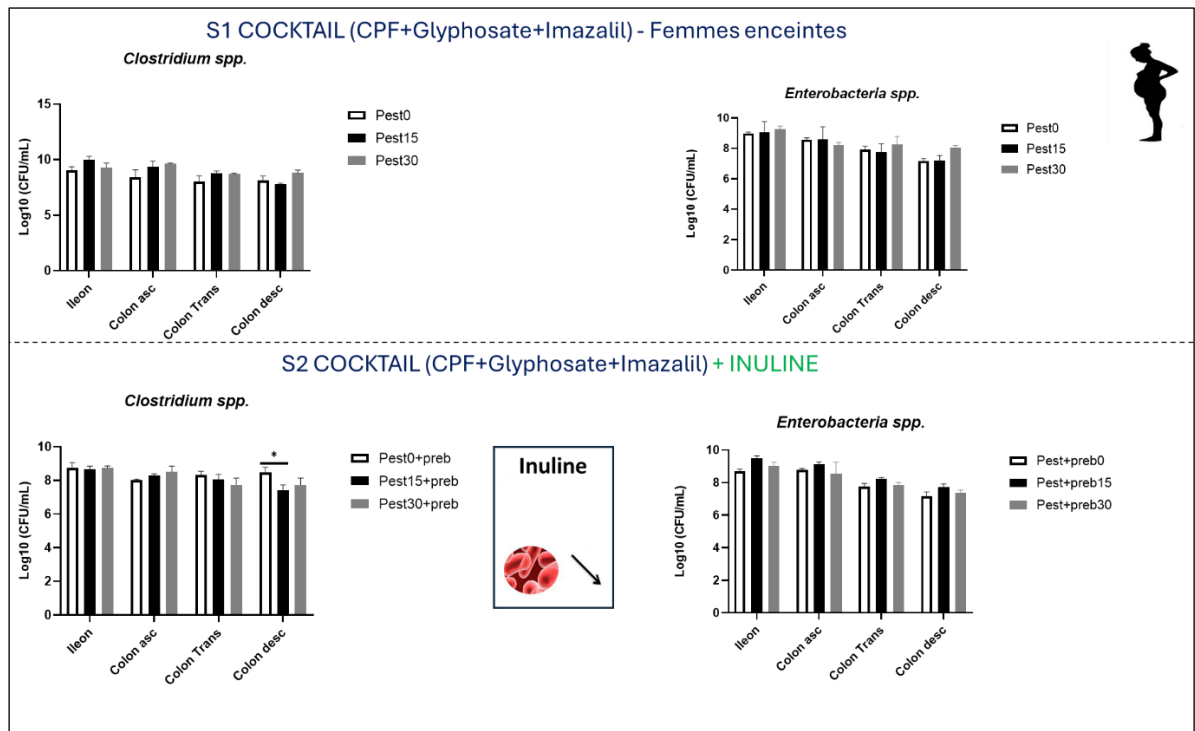


Figure 27: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore potentiellement pathogène du MI chez les femmes enceintes

Les résultats de la flore bénéfique n'ont pas montré d'effet significative après l'exposition au cocktail. (Fig. 27). Toutefois, l'inuline a induit une augmentation significative des bactéries bénéfiques, notamment : les *Lactobacilles* dans le F5 après 15 jours mais qui n'est pas maintenue jusqu'au 30^{ème} jour d'exposition ($p < 0,01$ vs Pest0+preb) et le F6 après 15 jours d'exposition ($p < 0,01$ vs Pest0+preb) et les *Bifidobactéries* après 15 jours dans le F4 ($p < 0,05$ vs Pest0+preb) et après 30 jours dans le F5 ($p < 0,05$ vs Pest0+preb).

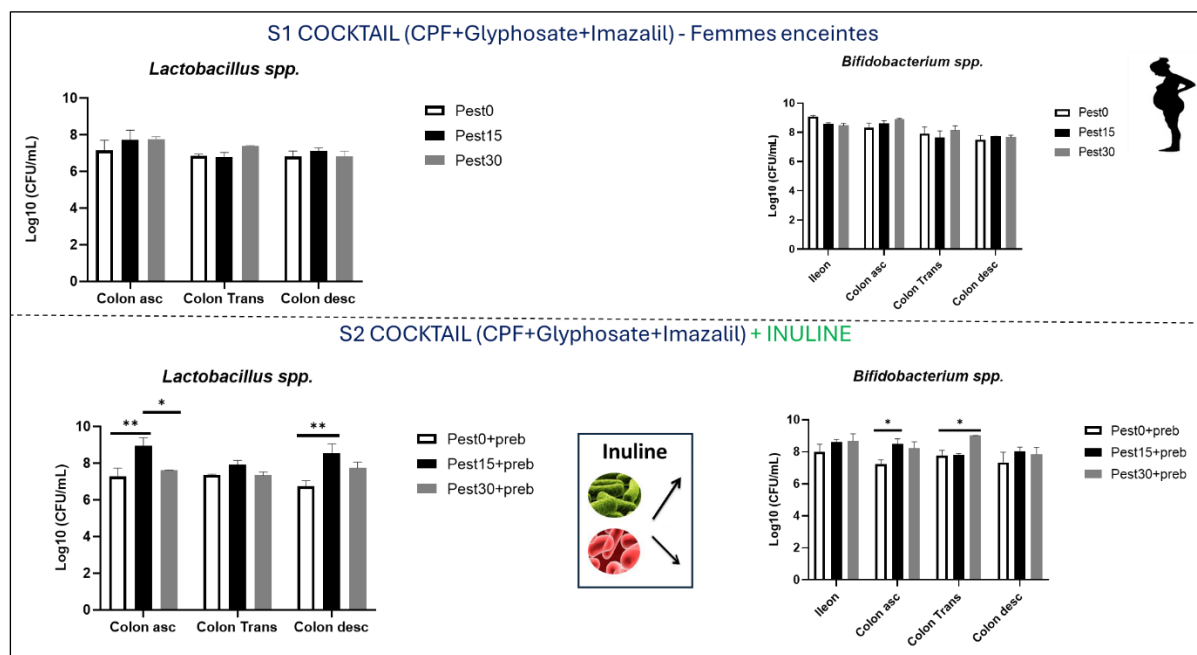


Figure 28: Effet du cocktail de pesticides et la supplémentation en inuline sur la flore bénéfique du MI chez les femmes enceintes

En résumé, les résultats quant à l'effet du cocktail de pesticides ont montré une diminution des *Bifidobactéries* dans le cas de la femme non enceinte et peu d'effet chez la femme enceinte. Contrairement au CPF seule, le cocktail contenant 1 mg de CPF et les doses de DJA de glyphosate et d'imazalil, n'a pas montré une hausse significative des bactéries *Clostridium* et *Entérobactéries* mais uniquement une hausse des *Entérocoques* potentiellement pathogènes (non montrés dans les figures). Cela pourrait suggérer que les interactions entre les différents pesticides modifient leur impact sur le MI par rapport à l'exposition à un seul pesticide et met en évidence la nécessité d'analyser d'autres genres bactériens ou espèces bactériennes qui pourraient être spécifiquement impactées par ce cocktail de manière différente à celle du CPF seul.

Toutefois, ce cocktail n'a pas empêché le rôle protecteur de l'inuline même en présence de 3 pesticides. Cela suggère que l'inuline pourrait aider à préserver un MI sain malgré des conditions environnementales défavorables. Ces résultats mettent en lumière la résilience du MI et son potentiel à s'adapter et à se protéger contre les perturbations grâce à des interventions prébiotiques

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

L'utilisation des pesticides dans l'agriculture continue à croître malgré les réglementations qui visent à la limiter, comme le témoigne le renouvellement récent de l'autorisation du glyphosate alors que les études ont montré ses effets délétères sur la santé (Le Monde, 2023).

La région des Hauts-de-France, fortement agricole et utilisatrice de pesticides notamment de l'insecticide organophosphoré neurotoxique le CPF, a l'un des plus mauvais taux en termes d'indicateurs de santé. En effet, les études expérimentales menées depuis une dizaine d'années, y compris celles du laboratoire PériTox, ont montré que l'exposition chronique aux résidus de pesticides perturbe l'équilibre du MI induisant une dysbiose intestinale (Joly Condette et al. 2015; Djekkoun et al. 2022a). Les altérations métaboliques et l'impact sur la perméabilité intestinale (favorisant la translocation bactérienne) peuvent avoir un impact important pour la santé en perturbant l'homéostasie, et ainsi participer directement ou indirectement à l'établissement de diverses maladies chroniques telles que l'obésité, le diabète de type 2, mais aussi les pathologies neurologiques avec des conséquences majeures pendant la période périnatale (Balaguer-Trias et al. 2022; Di Vincenzo et al. 2023). Les effets de ces facteurs environnementaux sur les barrières fonctionnelles, notamment la BI et la BHE, demeurent peu étudiés, tant dans la population générale que chez les groupes vulnérables, comme les femmes enceintes. Cette période de la vie est en effet caractérisée par une vulnérabilité accrue, touchant non seulement la mère mais aussi l'enfant à naître (Wright 2017; Fuhler 2020). Cependant, les données disponibles pour ces populations sont souvent fragmentaires, voire contradictoires (Edwards et al. 2017; Balaguer-Trias et al. 2022; Lesseur et al. 2022).

Dans cette optique, il semble essentiel d'étudier et de décrypter l'impact de ces facteurs environnementaux sur l'axe microbiote-intestin-cerveau chez la mère ainsi que la descendance et proposer une stratégie de prévention nutritionnelle via la co-exposition au prébiotique.

Cette thèse a pu combler cette lacune en explorant les effets chroniques du CPF sur la composition de la communauté bactérienne du MI et les conséquences sur la BI et la BHE chez la femme enceinte et le nouveau-né (Abou Diwan et al. 2024). Deux approches complémentaires ont été adoptées : une approche *in vivo* utilisant des rates gestantes et leur descendance, et une approche *in vitro* combinant trois modèles humains avancés : le modèle SHIME®, un modèle de BI utilisant des cellules épithéliales Caco-2, et un modèle de BHE basé sur la co-culture de cellules endothéliales et de péricytes humains. Une stratégie de prévention utilisant le prébiotique inuline a également été mise en œuvre pour contrer les effets des pesticides ([cf article in vitro soumis](#)).

Dans la première phase de cette étude, l'axe in vivo a permis d'explorer la dysbiose intestinale et ses effets sur la translocation bactérienne vers des organes stériles, ainsi que sur l'expression des jonctions serrées de la BHE chez les mères et leur progéniture. Ce modèle animal, préalablement validé, reproduit fidèlement les événements physiologiques caractéristiques de la gestation (Guibourdenche et al. 2021a; Djekkoun et al. 2022a). L'analyse a fait appel à diverses techniques, incluant des méthodes microbiologiques d'isolement et d'identification bactérienne, ainsi qu'à l'évaluation de l'expression des gènes et des protéines de la BHE via RT-qPCR et Western blot dans des fractions enrichies en microvaisseaux cérébraux.

L'exposition chronique des mères uniquement, à 1 mg/kg/jour de CPF pendant la gestation et la lactation, a eu des effets directs sur le MI et l'expression des JS et des molécules d'adhésion de la BHE chez les mères, ainsi que des effets indirects sur la progéniture femelle et mâle (Abou Diwan et al. 2024). Les résultats sur le MI ont révélé une dysbiose intestinale, caractérisée par une diminution des bactéries bénéfiques telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, et une augmentation des bactéries pathogènes comme *Escherichia coli*. Cette dysbiose a conduit à une translocation bactérienne vers des organes stériles, notamment la rate et le foie (Djekkoun et al. 2022a; Abou Diwan et al. 2024), ce qui a indiqué une atteinte de la perméabilité intestinale (Joly Condette et al. 2016; Nagpal and Yadav 2017).

Les analyses ont également révélé une réduction significative de l'expression des gènes des JS dans les microvaisseaux cérébraux, ce qui suggère que l'exposition au CPF compromet l'intégrité de la BHE. Cependant, les effets observés au niveau de la BHE variaient selon les sexes : la progéniture femelle présentait une augmentation de l'expression de la claudine 5 et de l'occludine, tandis que la progéniture mâle montrait une diminution de l'expression de la claudine 5. Cette observation est cohérente avec le rôle connu du CPF en tant que perturbateur endocrinien (Shaffo et al. 2018).

De plus, notre stratégie d'exposition visait à reproduire une exposition chronique à faible dose de CPF durant les premiers jours critiques de la vie, des périodes désignées comme des « fenêtres de vulnérabilité » selon le concept de la DOHaD. Cet accent sur l'exposition périnatale repose sur la reconnaissance que la vulnérabilité au CPF est particulièrement élevée durant le développement in utero et chez le nouveau-né, en raison des niveaux réduits de paraoxonestérase, une enzyme de détoxification, chez les enfants comparativement aux adultes (Rathod and Garg 2017). Ainsi, le CPF peut induire des effets néfastes chez le nouveau-né même à des doses inférieures à celles qui inhibent l'acétylcholinestérase (AChE). Nos résultats confirment les effets directs de l'exposition au CPF sur les mères durant la période périnatale, ainsi que ses effets indirects sur la progéniture, mettant en évidence des impacts à long terme de cette exposition précoce sur la santé des descendants.

Des études antérieures ont déjà mis en évidence que certains pesticides peuvent altérer la perméabilité de la BHE, en affectant les jonctions serrées et en augmentant le risque de neuroinflammation et de dysfonctionnements neuronaux.

Nos résultats confirment cette tendance, révélant une augmentation significative des marqueurs pro-inflammatoires, tels que l'ICAM-1, et l'expression des gènes NLRP3 chez la progéniture femelle, ainsi que TLR4 et NLRP3 chez la progéniture mâle, suggérant une neuroinflammation potentiellement induite par le CPF. Ces observations sont en accord avec des études précédentes qui associent l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules microgliales sous exposition au CPF à la neuroinflammation, un facteur clé dans les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Weis et al. 2021). Ainsi, l'activation de la neuroinflammation pourrait expliquer en partie l'impact du CPF sur les JS de la BHE.

L'exposition au CPF durant ces fenêtres de vulnérabilité semble donc non seulement compromettre l'intégrité de la BHE chez les mères, mais pourrait également entraîner des effets transgénérationnels en influençant le développement neurocérébral de la progéniture. Ces données soulignent la nécessité de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le CPF altère la BHE et la neuroinflammation, particulièrement dans des contextes de vulnérabilité accrue.

Notre approche in vivo a également révélé le rôle protecteur de l'inuline dans la modulation des effets du CPF tant chez les mères que la progéniture. L'inuline a partiellement atténué les effets délétères du CPF, en rétablissant l'équilibre du MI et réduisant la translocation bactérienne. De plus, elle a contribué à préserver l'intégrité de la BHE en préservant l'expression des gènes des JS. En tant que prébiotique, l'inuline favorise la croissance des bactéries bénéfiques dans l'intestin, ce qui peut aider à maintenir l'intégrité de la BI et à prévenir les effets délétères des toxines environnementales (Wang et al. 2023). Ces résultats suggèrent que la supplémentation en prébiotiques pourrait être une stratégie efficace pour atténuer les effets des pesticides sur la santé intestinale et systémique. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes précis par lesquels l'inuline exerce ses effets protecteurs.

Dans nos travaux précédemment publiés, nous avons démontré que l'exposition au CPF induisait des changements de poids corporel, des perturbations des métabolismes des lipides et du glucose, ainsi qu'une dysbiose chez les mères et leur progéniture (Guibourdenche et al. 2021a; Djekkoun et al. 2022a). Notre présente étude a confirmé ces résultats sur le MI chez la progéniture mâle, où nous avons observé une perturbation significative des populations bactériennes.

L'analyse des métabolites bactériens a permis d'interpréter ces résultats. En effet, la dysbiose intestinale a un impact sur AGCC (Joly Condette et al. 2022). En particulier, l'augmentation significative du ratio de l'acétate chez la progéniture et la diminution significative du butyrate due à l'exposition au CPF, ont

été prévenues par l'inuline. Ce changement dans le profil des métabolites bactériens résulte de la perturbation de l'homéostasie intestinale. Étant donné que la communauté microbienne est en contact continu avec la BI, les perturbations microbiennes après l'exposition au CPF menacent l'intégrité intestinale (Réquillé et al. 2018). Ces résultats confirment la diminution de la flore bactérienne bénéfique et nous aident à comprendre les mécanismes ultérieurs altérant la perméabilité de la BI et conduisant à la translocation bactérienne et des métabolites. La translocation bactérienne aérobie accrue vers la rate et le foie dans les groupes exposés au CPF a été empêchée par l'inuline.

Des résultats similaires dans des études précédentes ont montré que l'exposition au CPF (0,3 et 1 mg/kg/jour) peut perturber l'équilibre délicat des bactéries intestinales, en affectant spécifiquement la diversité et l'abondance des bactéries bénéfiques contribuant à la dysbiose intestinale (Joly Condette et al. 2015; Zhao et al. 2016; Perez-Fernandez et al. 2020). Étant donné que le MI est impliqué dans les systèmes immunitaire et endocrinien, les conséquences de la dysbiose induite par le pesticide sur la perméabilité intestinale et l'inflammation ont été étudiées (Yang et al. 2019; Guibourdenche et al. 2021a, b). En effet, une perturbation de la perméabilité intestinale marquée par une perturbation de l'expression des gènes des jonctions serrées de la BI a été observée chez la progéniture mâle des mères exposées à 1 mg/kg/jour de CPF pendant la gestation et la lactation. Une diminution significative de l'expression du gène de l'occludine a été détectée dans différents segments intestinaux, en plus des altérations de l'expression de la Zonula Occludens et de la claudine 4 (Condette et al. 2014; Guibourdenche et al. 2021). Une perturbation de la couche de mucus de la BI a également été observée chez la progéniture mâle. Ces résultats pourraient expliquer la translocation bactérienne observée dans notre étude microbiologique.

En ce qui concerne notre étude sur les microvaisseaux cérébraux, bien que la littérature existante indique que les pesticides peuvent influencer le microbiote intestinal et affecter la BHE, notre étude représente la première démonstration des effets du CPF sur les microvaisseaux cérébraux après métabolisation par le microbiote intestinal dans un modèle *in vivo*. Des études *in vitro* ont déjà montré que le CPF peut compromettre l'intégrité de la BHE, et des preuves ont été fournies indiquant que le CPF et son métabolite, le CPF-oxon, sont capables de traverser cette barrière (Parran et al. 2005). Le CPF a été détecté des deux côtés de la BHE, tandis que les métabolites trichloro-2-pyridinol (TCP) et CPF-oxon n'étaient présents que du côté abluminal. Ces résultats suggèrent que le CPF peut traverser la BHE et que l'activité enzymatique de la barrière peut métaboliser ce pesticide (Parran et al. 2005). De plus, Li et Ehrich ont démontré une diminution de la résistance électrique de la BHE et une altération de l'expression des gènes de la claudine-5 et de la ZO-1 *in vitro*, indiquant une perturbation et une perte d'intégrité de la BHE (Li and Ehrich 2013).

Notre étude s'appuie sur ces résultats en montrant que la dysbiose induite par le CPF affecte l'intégrité de la BHE par des mécanismes médiés par le MI. Bien que l'utilisation de modèles in vivo soit essentielle pour explorer ces interactions dans un système vivant, il est également crucial d'intégrer des modèles in vitro pour approfondir notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Les modèles in vitro peuvent fournir des informations détaillées sur les interactions spécifiques entre le CPF, le MI et la BHE, permettant ainsi d'identifier des cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques.

Dans le cadre de l'axe 2 de ce projet, nous avons enrichi nos observations issues de l'approche in vivo en recourant à des modèles in vitro combinés pour évaluer les effets du CPF sur la dysbiose intestinale et l'intégrité des barrières chez les femmes, en mettant particulièrement l'accent sur la grossesse. Les modèles utilisés incluaient le SHIME® simulant l'écosystème microbien de femmes en âge de procréer et de femmes enceintes, ainsi que des modèles cellulaires de BI et de BHE.

Afin de valider cette combinaison de modèles, nous avons analysé la stabilité du SHIME® et nous avons vérifié que l'exposition des cellules épithéliales et endothéliales au surnageants du SHIME® (sans pesticide) n'était pas toxique pour les cellules.

Les paramètres tels que la température, le pH et le potentiel redox ont été surveillés en continu, confirmant la robustesse du modèle, comme validé dans nos études antérieures des SHIME® mixtes (fèces d'hommes et femmes : population générale) (Reygner et al. 2016 ; Joly Condette et al. 2022). Des ajustements quotidiens ont permis de stabiliser le pH, essentiel au maintien d'un environnement propice à l'activité microbienne. Le potentiel redox, initialement supérieur à 0 mV, s'est stabilisé sous -200 mV, assurant des conditions anaérobies favorables à la croissance des bactéries anaérobies strictes.

En ce qui concerne les effets sur les cellules, la dilution (au 1/5) testée de SHIME® (filtré et centrifugé) pendant 24 h a permis de maintenir la perméabilité de la BI et la BHE comparable au contrôle, vérifiée par marquage des JS. Cette dilution a également amélioré la viabilité des cellules intestinales Caco-2, ce qui montre une interaction positive avec le MI. À l'inverse, la viabilité réduite des cellules endothéliales suggère qu'une exposition directe durant 24 h de la BHE au MI peut compromettre sa structure, justifiant des ajustements expérimentaux ([cf article de la méthodologie in vitro](#)). Ainsi, pour une approche plus réaliste, les cellules Caco-2 ont d'abord été exposées au SHIME®, puis leur compartiment basolatéral a été utilisé pour exposer la BHE, reproduisant davantage les interactions physiologiques ([cf article des résultats in vitro soumis](#)). En associant le modèle SHIME® avec des modèles de barrière, cette méthodologie innovante offre une vision plus complète des interactions au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau. Ce système in vitro combiné humain ouvre ainsi la voie à de nouvelles stratégies de recherche et à des approches thérapeutiques prometteuses.

La validation de cette combinaison de modèles nous a permis par la suite d'analyser les effets du CPF dans cette configuration *in vitro*. Les résultats ont révélé que l'exposition au CPF entraîne un déséquilibre intestinal significatif, avec une augmentation des bactéries potentiellement pathogènes et une modification du ratio des AGCC, confirmant ainsi les résultats de l'étude *in vivo*. De manière intéressante, nos résultats ont révélé des effets sur le MI plus prononcés chez la femme enceinte, en termes de dysbiose et de modification du ratio des AGCC. De plus, cette dysbiose a conduit à une augmentation de la perméabilité des cellules Caco-2 au FITC-dextran et à une translocation bactérienne vers le compartiment basolatéral, bien que la BHE n'ait pas été directement affectée dans ce modèle. Le résultat de l'immunomarquage des JS des Caco-2 concordait avec l'augmentation de la perméabilité. Ces résultats confirment que le CPF peut compromettre l'intégrité de la BI, augmentant ainsi le risque de translocation bactérienne et d'inflammation systémique.

Ces résultats sont particulièrement pertinents car ils soulignent les différences potentielles dans la réponse au CPF entre les femmes enceintes et non enceintes. La grossesse est une période de vulnérabilité accrue en raison des changements physiologiques et immunologiques qui se produisent (Fuhler 2020). Les perturbations du MI pendant cette période peuvent entraîner des conséquences à long terme sur la santé maternelle et fœtale (Edwards et al. 2017). Cette étude a donc fourni des preuves importantes de la nécessité de prendre en compte les états physiologiques spécifiques, tels que la grossesse, dans les évaluations toxicologiques des pesticides.

Le modèle de la BHE a été utilisé pour évaluer les effets du CPF sur cette barrière critique. Les résultats ont montré que, bien que la BHE ne soit pas directement affectée par la dysbiose induite par le CPF dans le modèle SHIME® (non filtré) après 4h d'exposition des cellules endothéliales, l'exposition prolongée au CPF peut néanmoins compromettre l'intégrité de la BHE en réduisant l'expression des protéines des JS. Ces résultats suggèrent que, bien que la BHE puisse initialement résister aux effets de la dysbiose intestinale, une exposition prolongée au CPF peut finalement compromettre son intégrité. Cela souligne l'importance de minimiser l'exposition aux pesticides pour protéger la santé neurologique, en particulier chez les populations vulnérables telles que les femmes enceintes.

L'étude *in vitro* a également confirmé l'effet protecteur de l'inuline. L'inuline a restauré l'équilibre du MI et a empêché la translocation bactérienne, soulignant son potentiel comme mesure préventive contre la dysbiose induite par les pesticides.

De plus, pour la première fois, nous avons utilisé le modèle intestinal SHIME® pour quantifier le CPF et ses métabolites, ce qui nous permet d'explorer sa métabolisation par le MI. Jusqu'à présent, cette métabolisation n'avait été étudiée que dans des contextes limités, tels que le sol ou certaines souches bactériennes spécifiques (Harishankar et al. 2013; Supreeth and Raju 2017). Notre dosage semi-

quantitatif a montré une diminution du CPF entre l'estomac et le colon descendant sans détection de ses métabolites (TCP et CPF-oxon). Cela pourrait indiquer que la concentration de ces métabolites est trop faible pour être détectée, que leur dégradation s'est produite rapidement, ou que le CPF a été absorbé par les bactéries intestinales. L'utilisation d'une technique de détection plus sensible pourrait fournir des informations complémentaires sur la dégradation du CPF. De plus, sa dégradation plus rapide en présence de l'inuline nécessite une recherche plus poussée pour vérifier si le CPF peut se lier à l'inuline ou si tout simplement sa dégradation rapide est due à l'augmentation des bactéries pouvant le métaboliser comme les bactéries *Lactobacillus* (Harishankar et al. 2013).

Bien que l'étude in vitro ait fourni des informations précieuses sur le plan mécanistique et constitue une alternative aux expérimentations animales, elle présente certaines limites. En effet, les modèles in vitro, malgré leurs avancées, ne peuvent pas entièrement reproduire la complexité des interactions in vivo. Cependant, en combinant ces approches, nous obtenons une compréhension plus complète des mécanismes en jeu. Les études futures devraient explorer plus en détail les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets protecteurs des prébiotiques et évaluer leur efficacité dans des modèles animaux et cliniques. Cela permettra d'optimiser les stratégies d'intervention pour la santé intestinale et neurologique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

En conclusion, cette thèse a permis de simuler la grossesse et la période périnatale à l'aide de notre étude *in vivo*, de valider une nouvelle approche *in vitro* intégrée et de comparer la réponse aux pesticides entre les femmes non enceintes et enceintes.

Les résultats de ces approches complémentaires ont mis en lumière les effets délétères des pesticides, en particulier le CPF, sur le MI et les barrières biologiques, ainsi que le potentiel protecteur des prébiotiques comme l'inuline. Les résultats soulignent l'importance de considérer les états physiologiques tels que la grossesse dans les recherches toxicologiques et de développer des stratégies préventives pour protéger la santé maternelle et fœtale, la femme enceinte étant vulnérable à l'exposition chronique aux contaminants alimentaires.

Les études menées ont démontré que l'exposition aux pesticides peut induire une dysbiose intestinale, augmenter la perméabilité intestinale et entraîner une translocation bactérienne, compromettant ainsi l'intégrité des barrières biologiques. Cependant, la supplémentation en inuline a montré des effets protecteurs significatifs, rétablissant l'équilibre du MI et prévenant la translocation bactérienne.

Ces observations ouvrent la voie à de nouvelles recherches sur les interventions préventives et thérapeutiques pour atténuer les effets des pesticides sur la santé humaine. Il est crucial de poursuivre les études pour mieux comprendre les mécanismes d'action des prébiotiques et leur potentiel dans la prévention des maladies liées à la dysbiose intestinale et à la perturbation des barrières biologiques.

En outre, les résultats de cette thèse soulignent la nécessité de politiques de santé publique visant à réduire l'exposition aux pesticides, en particulier chez les populations vulnérables telles que les femmes enceintes. La promotion de régimes alimentaires riches en prébiotiques pourrait constituer une approche complémentaire pour protéger la santé intestinale et systémique contre les effets néfastes des résidus de pesticides.

Enfin, cette thèse a contribué à une meilleure compréhension des interactions complexes entre les pesticides, le MI et les barrières biologiques, et a mis en évidence l'importance de stratégies préventives pour atténuer les risques pour la santé associés à l'exposition chronique à faible dose aux pesticides.

Les recherches futures devraient continuer à explorer ces interactions et à développer des interventions efficaces pour protéger la santé humaine dans un environnement de plus en plus exposé aux contaminants chimiques. Les résultats de cette thèse ouvrent de nombreuses perspectives pour des recherches futures.

Tout d'abord, nous pouvons approfondir nos analyses microbiologiques par q PCR d'ADN bactérien en recherchant d'autres populations ou espèces bactériennes permettant d'interpréter nos résultats de métabolites bactériens comme les espèces productrices de butyrate notamment les *Clostridium* de cluster IV et XIV (Guo et al. 2020; Verstraeten et al. 2024). Nous rechercherons aussi des espèces de *Bifidobactéries* en plus de *B. longum* : nous analyserons *B. adolescentis* et *B. bifidum* afin de mieux comprendre l'effet bifidogène de l'inuline et si le CPF diminue ces bactéries bénéfiques (Ramirez-Farias et al. 2008). Nous pourrions aussi approfondir notre recherche d'espèces *Lactobacillus* : *L. casei*, *L. reuteri*, *L. fermentum* et *L. rhamnosus* (Banfi et al. 2021; Morais et al. 2021).

Nous envisageons ensuite de compléter nos résultats de métabolites bactériens par le dosage du LPS dans les fermenteurs du SHIME® et par la suite doser les cytokines pro-inflammatoires et étudier l'expression des JS par RT q PCR au niveau des modèles cellulaires afin de mieux comprendre la perturbation de la perméabilité intestinale qui entraîne une translocation bactérienne. Le LPS étant un activateur de la voie NF-κB, nous pourrions ensuite analyser l'expression transcriptionnelle et protéique des acteurs de cette voie (Long et al. 2021).

Nous avons commencé des analyses d'ELISA (Human LPS ELISA kit, Clinisciences) préliminaires qui nous ont déjà donné une idée de l'augmentation du LPS dans le SHIME® après 15 jours d'exposition au CPF, qui au contraire n'a pas été détecté après 15 et 30 jours au CPF+inuline. Cette première expérience nous a confirmé l'augmentation des bactéries Gram - (confirmant l'augmentation des *Entérobactéries*) par le CPF et leur diminution par la supplémentation en inuline. Des expériences supplémentaires seront réalisées afin de valider ces résultats et vérifier s'il existe des différences significatives entre la femme enceinte et non-enceinte en termes d'inflammation, et tester différentes durées d'exposition des cellules au SHIME® (48h, ensuite plusieurs jours).

Dans un deuxième temps, pour décrypter les mécanismes impliqués dans les interactions entre le MI et la BHE, nous pourrions mesurer les métabolites neuroactifs produits par le MI, tels que le tryptophane, l'indole, la sérotonine et le GABA (Cryan et al. 2019). Des résultats préliminaires de dosage d'échantillons SHIME 10x dilués, par LC-MS/MS, issus d'une collaboration, ont révélé une première observation.

Ces résultats montrent des variations que nous ne pouvons pas pour l'instant qualifier de significatives (diminution de dopamine dans le F3, F4 et F5 ; de tryptamine dans le F3, F4 et F6 et de tryptophane dans le F4 – augmentation du GABA dans le F3, F4 et F6). L'interprétation de ces données nécessitent plus d'expériences et le dosage sans dilution de 10x afin de confirmer la non-détection dans certains échantillons et la significativité des variations observées.

Tableau 2: Tableau représentant des résultats préliminaires de dosage de métabolites microbiens neuroactifs.

Echantillon SHIME	Concentration (µM) - (dilution 10x du SHIME)				
	Indole	Tryptophane	Dopamine	Tryptamine	GABA
F3 CPF0	57.32	127.3	3.28	1	34.2
F3 CPF15	63.34	144.72	3.12	0.71	101.81
F3 CPF30	58.2	130.59	N/A	0.6	36.27
F4 CPF0	68.12	177.83	4.28	1.27	37.84
F4 CPF15	55.32	136.08	3.15	0.82	63.67
F4 CPF30	N/A	52.71	N/A	0.52	35.35
F5 CPF0	N/A	27.29	3.3	0.82	34
F5 CPF15	34.9	47.43	N/A	0.68	25.27
F5 CPF30	N/A	27.92	2.9	0.56	38.55
F6 CPF0	N/A	26.75	N/A	1.07	36.26
F6 CPF15	N/A	29.91	N/A	0.67	53.09
F6 CPF30	N/A	28.04	N/A	0.65	40.14

Toutefois, les impacts chroniques de l'exposition à des cocktails de pesticides, sur le MI, la BI et la BHE, restent peu étudiés (Mao et al. 2018b; Zhang et al. 2023a). La majorité des recherches se sont concentrées sur les effets individuels des pesticides, négligeant souvent les interactions complexes et synergiques qui peuvent survenir lorsque plusieurs pesticides sont présents simultanément (Martins-gomes et al. 2022; Zhang et al. 2023a). L'avancée dans ces études est nécessaire car dans les pratiques agricoles réelles, les cultures sont souvent traitées avec des mélanges de pesticides pour maximiser l'efficacité contre divers ravageurs et maladies. Dans notre projet, nous avons commencé par la combinaison de trois pesticides : le CPF, le glyphosate et l'imazalil. Alors que nous nous attendions à des effets sur le MI plus prononcés, nos analyses microbiologiques n'ont pas montré un effet significatif de ce cocktail. Cela pourrait indiquer que les interactions entre différents pesticides modifient leur impact sur le MI par rapport à une exposition à un seul pesticide. Cela souligne l'importance d'analyser d'autres genres ou espèces bactériennes qui pourraient être spécifiquement affectés par ce mélange de pesticides, de manière différente de l'exposition au CPF seul. Des études à long terme seraient nécessaires pour comprendre les effets chroniques de l'exposition aux cocktails de pesticides sur le MI, afin de déterminer si les changements observés sont transitoires ou permanents.

Cependant, l'addition de l'inuline a montré des effets significatifs très bénéfiques comme la diminution des *Clostridium spp* et l'augmentation de *Lactobacilles* et *Bifidobactéries* même en présence de ces trois pesticides.

Il serait également intéressant de combiner les pesticides à d'autres facteurs environnementaux perturbateurs de l'homéostasie comme les lipides saturés, afin de mieux comprendre leur impact combiné sur la santé humaine (El Khayat El Sabbouri et al. 2020; Djekkoun et al. 2022b; Lahimer et al. 2023).

De plus, dans le but d'améliorer et valider davantage l'approche intégrée in vitro, nous pouvons introduire des modèles de barrières plus complexes ou plusieurs. En d'autres termes, il existe plusieurs types de modèles de BI à base de Caco-2 (Haddad et al. 2023). Si nous arrivons à trouver le même effet délétère du pesticide sur 2 ou plusieurs types de modèles Caco-2, nous validerons la reproductibilité de notre méthode. On se pose aussi la question de s'il est possible de mimer la BI et la BHE d'une femme enceinte comme nous avons pu reproduire le MI d'une population de femmes enceintes. Une proposition pourrait d'induire au sein du milieu nutritif des cellules un environnement similaire à celui d'une femme enceinte. En d'autres termes, en se basant sur les variations immunitaires et hormonales ayant lieu durant la grossesse, nous pouvons mimer des quantités d'hormones et de cytokines similaires à celles retrouvées dans le sang d'une femme enceinte (Edwards et al. 2017; Fuhler 2020). Cela nécessite des études approfondies de dosage de « biomarqueurs » ou molécules dans le sang directement liées à un état de grossesse, cela reste une hypothèse à tester et valider.

Enfin, l'amélioration ou le développement de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques, basées sur la modulation du MI, pourrait offrir des solutions prometteuses pour neutraliser les effets néfastes des pesticides. Nous pourrions proposer une stratégie basée sur la combinaison de prébiotiques et de probiotiques ou bien de prébiotiques et de produits anti-oxydants (Anderson et al. 2023; Küçükler et al. 2024). Ces recherches futures contribueront à une meilleure compréhension des interactions complexes entre les contaminants environnementaux et la santé humaine, et permettront de développer des interventions plus efficaces pour protéger les populations vulnérables.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, et al (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37:13–25
- Abou Diwan M, Djekkoun N, Marie-Christine B, et al (2024) Maternal exposure to pesticides induces perturbations in the gut microbiota and blood – brain barrier of dams and the progeny , prevented by a prebiotic. *Environ Sci Pollut Res.*
<https://doi.org/10.1007/s11356-024-34969-1>
- Abou Diwan M, Lahimer M, Bach V, et al (2023) Impact of Pesticide Residues on the Gut-Microbiota – Blood – Brain Barrier Axis : A Narrative Review
- Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, et al (2019) Pesticides, history, and classification. *Nat Remedies Pest, Dis Weed Control* 29–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8>
- Akashe MM, Pawade U V, Nikam A V (2018) Classification of Pesticides: a Review. *Int J Res Ayurveda Pharm* 9:144–150. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.094131>
- Akhtar M, Chen Y, Ma Z, et al (2021) Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Anim Nutr (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)* 8:350–360. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2021.11.005>
- Akimowicz M, Srednicka P, Juszczuk-kubiak E, et al (2021) Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination : A review. *Food Chem Toxicol* 153:. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112306>
- Al-Sadi R, Youssef M, Rawat M, et al (2019) MMP-9-induced increase in intestinal epithelial tight permeability is mediated by p38 kinase signaling pathway activation of MLCK gene. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 316:G278–G290.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00126.2018>
- Alphonsus CS, Rodseth RN (2014) The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 69:777–784. <https://doi.org/10.1111/ANAE.12661>
- Anderson SC, Cryan JF, Dinan T (2023) The Psychobiotic Revolution. *National Geographic*
- ANSES (2011) Avis de l’Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail relatif à une demande d’autorisation de mise sur le marché de la préparation NURELLE D 220 et de sa préparation identique GEOTION TX à base de chlorpyriph
- Anwar H, Irfan S, Hussain G, et al (2020) Gut Microbiome: A New Organ System in Body. *Parasitol Microbiol Res.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.89634>
- Appleton J (2018) The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. *Integr Med* 17:
- Azpiroz F, Bernalier-Donadille A, Blottière H, et al (2004) Flore microbienne intestinale, Physiopathologie et pathologie digestives, John Libbe. John Libbey Eurotext
- Backhed F, Roswall J, Peng Y, et al (2015) Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life Resource Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 690–703.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.004>
- Balaguer-Trias J, Deepika D, Schuhmacher M, Kumar V (2022) Impact of Contaminants on Microbiota: Linking the Gut–Brain Axis with Neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031368>

- Banfi D, Moro E, Bosi A, et al (2021) Impact of microbial metabolites on microbiota–gut–brain axis in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Sci* 22:1–42.
<https://doi.org/10.3390/ijms22041623>
- Baudry J, Rebouillat P, Allès B, et al (2021) Estimated dietary exposure to pesticide residues based on organic and conventional data in omnivores, pesco-vegetarians, vegetarians and vegans. *Food Chem Toxicol* 153:112179.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112179>
- Berton T, Mayhoub F, Chardon K, et al (2014) Development of an analytical strategy based on LC-MS/MS for the measurement of different classes of pesticides and their metabolites in meconium: Application and characterisation of foetal exposure in France. *Environ Res* 132:311–320. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.034>
- Bieczynski F, Paineofilú JC, Venturino A, et al (2021) Expression and Function of ABC Proteins in Fish Intestine. *Front Physiol* 12:1–21.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.791834>
- Brahmand MB, Yunesian M, Nabizadeh R, et al (2019) Evaluation of chlorpyrifos residue in breast milk and its metabolite in urine of mothers and their infants feeding exclusively by breast milk in north of Iran. *J Environ Heal Sci Eng*
- Brittany D. Needham MF, Adame MD, Wang Z, et al (2022) A gut-derived metabolite alters brain activity and anxiety behaviour in mice. *Nature* 602:647–653.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-04396-8>.
- Brousse F, Malonga G, Yang G, Sadeg N (2019) Assessment of Exposure to Organic and Inorganic Pollutants in Children ’ s Hair. *Int J Public Heal Res* 7:18–22
- Brown LS, Foster CG, Courtney JM, et al (2019) Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. *Front Cell Neurosci* 13:457589.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00282/BIBTEX>
- Bruckner J V. (2000) Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: The NAS panel report. *Regul Toxicol Pharmacol* 31:280–285.
<https://doi.org/10.1006/rtp.2000.1393>
- Buffet-Bataillon S, Bellanger A, Boudry G, et al (2021) New Insights Into Microbiota Modulation-Based Nutritional Interventions for Neurodevelopmental Outcomes in Preterm Infants. *Front Microbiol* 12:676622.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.676622/BIBTEX>
- Butel MJ, Waligora-Dupriet AJ, Wydau-Dematteis S (2018) The developing gut microbiota and its consequences for health. *J Dev Orig Health Dis* 9:590–597.
<https://doi.org/10.1017/S2040174418000119>
- Campeotto F, Waligora-Dupriet AJ, Doucet-Populaire F, et al (2007) Mise en place de la flore intestinale du nouveau-né. *Gastroentérologie Clin Biol* 31:533–542.
[https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(07\)89424-3](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(07)89424-3)
- Carrasco Cabrera L, Medina Pastor P (2021) The 2019 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA J* 19:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6491>
- Carvalho FP (2017) Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur* 6:48–60.
<https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, et al (2014) A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 9:.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099733>

- Chedik L, Bruyere A, Bacle A, et al (2018) Interactions of pesticides with membrane drug transporters: implications for toxicokinetics and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 14:739–752. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1487398>
- Chen YH, Tsai WH, Wu HY, et al (2019) Probiotic lactobacillus spp. Act against helicobacter pylori-induced inflammation. *J Clin Med* 8:. <https://doi.org/10.3390/JCM8010090>
- Chen Z, Li G (2020) Immune response and blood – brain barrier dysfunction during viral neuroinvasion. *Innate Immun.* <https://doi.org/10.1177/1753425920954281>
- Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, et al (2005) Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: A new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 85:734–746. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700281>
- Collins SM, Surette M, Bercik P (2012) The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:735–742
- Condette CJ, Khorsi-Cauet H, Morlière P, et al (2014) Increased gut permeability and bacterial translocation after chronic chlorpyrifos exposure in rats. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102217>
- Cryan JF, Dinan TG (2012) Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.* 13:701–712
- Cryan JF, O’riordan KJ, Cowan CSM, et al (2019) The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev* 99:1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Cuffaro B, Assouhoun ALW, Boutillier D, et al (2021) Identification of New Potential Biotherapeutics from Human Gut Microbiota-Derived Bacteria. *Microorg* 2021, Vol 9, Page 565 9:565. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9030565>
- Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, et al (2008) An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol Vitro* 22:799–811. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2007.12.016>
- D’Amelio PD (2017) Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcif Tissue Int.* <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>
- Daguet D, Pinheiro I, Verhelst A, Possemiers S (2016) Arabinogalactan and fructooligosaccharides improve the gut barrier function in distinct areas of the colon in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *J Funct Foods* 20:369–379. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.005>
- Daisley BA, Monachese M, Trinder M, et al (2019) Immobilization of cadmium and lead by Lactobacillus rhamnosus GR-1 mitigates apical-to- basolateral heavy metal translocation in a Caco-2 model of the intestinal epithelium intestinal epithelium. *Gut Microbes* 10:321–333. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1526581>
- Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K (2019) The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16:461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>
- Daneman R, Prat A (2015) The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Daneman R, Rescigno M (2009) Review The Gut Immune Barrier and the Blood-Brain Barrier : Are They So Different ? *Immunity* 31:722–735. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.012>

- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA (2010) Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nat* 2010 468:562–566.
<https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, et al (2019) Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* 1–27.
<https://doi.org/10.3390/foods8030092>
- de Aquino CC, Leitão RA, Alves LAO, et al (2019) Effect of hypoproteic and high-fat diets on hippocampal blood-brain barrier permeability and oxidative stress. *Front Nutr* 5:.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00131>
- Dehouck M -P, Méresse S, Delorme P, et al (1990) An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood–Brain Barrier In Vitro. *J Neurochem* 54:1798–1801. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1990.TB01236.X>
- Deligne C (2020) Évaluation in vitro du rôle de la barrière hémato- encéphalique dans la chimiorésistance des gliomes infiltrants du tronc cérébral de l'enfant. Université d'Artois
- Di Vincenzo F, Del Gaudio A, Petito V, et al (2023) Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Intern Emerg Med*.
<https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>
- Dinan TG, Cryan JF (2017) The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 46:77–89
- Ding X, Hu X, Chen Y, et al (2021) Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends. *Trends Food Sci Technol* 107:455–465. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.11.015>
- Djekkkoun N, Depeint F, Guibourdenche M, et al (2022a) Chronic Perigestational Exposure to Chlorpyrifos Induces Perturbations in Gut Bacteria and Glucose and Lipid Markers in Female Rats and Their Offspring. *Toxics*
- Djekkkoun N, Depeint F, Guibourdenche M, et al (2022b) Perigestational exposure of a combination of a high - fat diet and pesticide impacts the metabolic and microbiotic status of dams and pups ; a preventive strategy based on prebiotics. *Eur J Nutr*.
<https://doi.org/10.1007/s00394-022-03063-y>
- Djekkkoun N, Lalau JD, Bach V, et al (2021) Chronic oral exposure to pesticides and their consequences on metabolic regulation: role of the microbiota. *Eur J Nutr* 60:4131–4149.
<https://doi.org/10.1007/s00394-021-02548-6>
- Doroszkievicz J, Groblewska M, Mroczko B (2021) The role of gut microbiota and gut–brain interplay in selected diseases of the central nervous system. *Int J Mol Sci* 22:.
<https://doi.org/10.3390/ijms221810028>
- Edwards SM, Cunningham SA, Dunlop AL, et al (2017) The Maternal Gut Microbiome during Pregnancy. *MCN, Am J Matern Nurs* 42:310–317.
<https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000372>
- EFSA (2019) Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos
- Ehrlich P (1885) *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: eine farbenanalytische Studie.* Hirschwald, Berlin 167
- El Khayat El Sabbouri H, Gay-Quéheillard J, Joumaa WH, et al (2020) Does the perigestational exposure to chlorpyrifos and/or high-fat diet affect respiratory

- parameters and diaphragmatic muscle contractility in young rats? *Food Chem Toxicol* 140:111322. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111322>
- Engelhardt B, Liebner S (2014) Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 355:687–699. <https://doi.org/10.1007/S00441-014-1811-2/FIGURES/2>
- EPA (2021) Frequent Questions about the Chlorpyrifos 2021 Final Rule | US EPA. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/frequent-questions-about-chlorpyrifos-2021-final-rule>. Accessed 5 Mar 2023
- Fame RM, Lehtinen MK (2020) Emergence and Developmental Roles of the Cerebrospinal Fluid System. *Dev Cell* 52:261–275. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.01.027>
- Fan J (2017) Pharmacokinetics *Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.09.007>
- FAO/ WHO (2009) International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides Guidelines on Developing a Reporting System for Health and Environmental Incidents Resulting from Exposure to Pesticide
- FAOSTAT (2022) Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators. In: *Pestic. use, Pestic. trade Pestic. Indic.*
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59:221–226. <https://doi.org/10.1093/JNCI/59.1.221>
- Fuhler GM (2020) The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 44–45:101671. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2020.101671>
- Galea I (2021) The blood – brain barrier in systemic infection and in inflammation. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
- Gao B, Bian X, Chi L, et al (2017) Organophosphate Diazinon altered quorum sensing, cell motility, stress response, and carbohydrate metabolism of gut microbiome. *Toxicol Sci* 157:354–364. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx053>
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gilani RA, Rafique M, Rehman A, et al (2016) Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *J Basic Microbiol* 56:105–119. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201500336>
- Goldmann E (1913) Vitalfärbungen am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute. *Abh Preuss Akad Wiss Phys -Math* 1:1–60
- Gosselet F (2017) Modélisation in vitro de la barrière hémato-encéphalique. *Medecine/Sciences* 33:423–431
- Gosselet F, Azevedo R, Roig A, et al (2021) Neurochemistry International Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochem Int* 144:104952. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104952>
- Gosselet F, Saint-Pol J, Candela P, Fenart L (2013) Amyloid- β ; Peptides, Alzheimer's Disease and the Blood-brain Barrier. *Curr Alzheimer Res* 10:1015–1033. <https://doi.org/10.2174/15672050113106660174>
- Gosselet F, Saint-Pol J, Fenart L (2014) Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 446:687–691.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.059>

- Guibourdenche M, El Khayat El Sabbouri H, Djekkoun N, et al (2021a) Programming of intestinal homeostasis in male rat offspring after maternal exposure to chlorpyrifos and/or to a high fat diet. *Sci Rep* 11:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90981-2>
- Guibourdenche M, Haug J, Chevalier N, et al (2021b) Food Contaminants Effects on an In Vitro Model of Human Intestinal Epithelium. *Toxics* 2021, Vol 9, Page 135 9:135. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9060135>
- Guichard L, Dedieu F, Jeuffroy MH, et al (2017) Le plan Ecophyto de réduction d’usage des pesticides en France : décryptage d’un échec et raisons d’espérer. *Cah Agric* 26:14002. <https://doi.org/10.1051/CAGRI/2017004>
- Guo P, Zhang K, Ma X, He P (2020) Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *J Anim Sci Biotechnol* 11:1–10. <https://doi.org/10.1186/S40104-019-0402-1/FIGURES/2>
- Haddad MJ, Sztupecki W, Delayre-Orthez C, et al (2023) Complexification of In Vitro Models of Intestinal Barriers, A True Challenge for a More Accurate Alternative Approach. *Int J Mol Sci* 24:. <https://doi.org/10.3390/IJMS24043595>
- Harishankar MK, Sasikala C, Ramya M (2013) Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *3 Biotech* 3:137–142. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0078-0>
- Heymans M, Figueiredo R, Dehouck L, et al (2020) Contribution of brain pericytes in blood-brain barrier formation and maintenance: A transcriptomic study of cocultured human endothelial cells derived from hematopoietic stem cells. *Fluids Barriers CNS* 17:1–28. <https://doi.org/10.1186/S12987-020-00208-1/FIGURES/7>
- Hoffman JD, Yancello LM, Chlipala G, et al (2019) Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221828>
- Idrees M, Imran M, Atiq N, et al (2022) Probiotics , their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.959941>
- INSERM (2021) Microbiote intestinale (flore intestinale) · Inserm, La science pour la santé. <https://www.inserm.fr/dossier/microbiote-intestinale-flore-intestinale/#a-chacun-son-microbiote>. Accessed 29 Aug 2024
- IOWA (2022) Updates on Chlorpyrifos Uses in 2022 | Integrated Crop Management
- Jaglin M (2013) Axe intestin-cerveau : effets de la production d’indole par le microbiote intestinal sur le système nerveux central. Université Paris Sud - Paris XI
- Jagtiani E, Yeolekar M, Naik S, Patravale V (2022) In vitro blood brain barrier models: An overview. *J Control Release* 343:13–30. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.01.011>
- Jin C, Xia J, Wu S, et al (2018) Insights Into a Possible Influence on Gut Microbiota and Intestinal Barrier Function During Chronic Exposure of Mice to Imazalil. *Toxicol Sci* 162:113–123. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx227>
- Jin C, Yuan X, Wang C, et al (2021) Maternal exposure to imazalil disrupts intestinal barrier and bile acids enterohepatic circulation tightly related IL-22 expression in F0, F1 and F2 generations of mice. *J Hazard Mater* 403:123668. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123668>

- Jin C, Zeng Z, Fu Z, Jin Y (2016) Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice. *Chemosphere* 160:349–358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.105>
- Joly Condet C, Bach V, Mayeur C, et al (2015) Chlorpyrifos Exposure during Perinatal Period Affects Intestinal Microbiota Associated with Delay of Maturation of Digestive Tract in Rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 61:30–40. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000734>
- Joly Condet C, Djekkoun N, Reygnier J, et al (2022) Effect of daily co-exposure to inulin and chlorpyrifos on selected microbiota endpoints in the SHIME® model. *Environ Pollut* 302:118961. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.118961>
- Joly Condet C, Elion Dzon B, Hamdad F, et al (2016) Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract of chlorpyrifos-exposed rats. *Gut Pathog* 8:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0129-x>
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C (2015) Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev* 73:426–437. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUU016>
- Jovel J, Dieleman LA, Kao D, et al (2018) The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Metagenomics Perspect Methods, Appl* 13 No. 6:197–213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102268-9.00010-0>
- Kadry H, Noorani B, Cucullo L (2020) A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* 17:1–24. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kaur R (2018) Metabolism of pesticides by human Cytochrome P450 (CYPs). *Int J Creat Res Thoughts*. <https://doi.org/10.1729/IJCRT.17464>
- Knox EG, Aburto MR, Clarke G, et al (2022) The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration. *Mol Psychiatry* 27:2659–2673. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01511-z>
- Kuchheuser P, Birringer M (2022) Pesticide residues in food in the European Union: Analysis of notifications in the European Rapid Alert System for Food and Feed from 2002 to 2020. *Food Control* 133:108575. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108575>
- Küçükler S, Caglayan C, Özdemir S, et al (2024) Hesperidin counteracts chlorpyrifos-induced neurotoxicity by regulating oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Metab Brain Dis* 39:509–522. <https://doi.org/10.1007/s11011-023-01339-8>
- Kutuzov N, Flyvbjerg H, Lauritzen M (2018) Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood–brain Barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E9429–E9438. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1802155115/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Lahimer M, Djekkoun N, Tricotteaux-Zarqaoui S, et al (2023) Impact of Perinatal Coexposure to Chlorpyrifos and a High-Fat Diet on Kisspeptin and GnRHR Presence and Reproductive Organs. *Toxics* 2023, Vol 11, Page 789 11:789. <https://doi.org/10.3390/TOXICS11090789>
- Lecerf JM, Dépeint F, Clerc E, et al (2012) Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. *Br J Nutr* 108:1847–1858. <https://doi.org/10.1017/S0007114511007252>

- Lee B, Moon KM, Kim CY (2018) Review Article Tight Junction in the Intestinal Epithelium : Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res* 2018:
- Lesseur C, Pathak K V, Pirrotte P, et al (2022) Urinary glyphosate concentration in pregnant women in relation to length of gestation. *Environ Res* 203:111811. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111811>
- Li D, Wu M (2021) Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021 61 6:1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
- Li JW, Fang B, Pang GF, et al (2019) Age- and diet-specific effects of chronic exposure to chlorpyrifos on hormones, inflammation and gut microbiota in rats. *Pestic Biochem Physiol* 159:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.018>
- Li W, Ehrich M (2013) Transient alterations of the blood-brain barrier tight junction and receptor potential channel gene expression by chlorpyrifos. *J Appl Toxicol* 33:1187–1191. <https://doi.org/10.1002/jat.2762>
- Li Y, Liu A, Chen K, et al (2024) Sodium butyrate alleviates lead-induced neuroinflammation and improves cognitive and memory impairment through the ACSS2/H3K9ac/BDNF pathway. *Environ Int* 184:108479. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2024.108479>
- Linares R, Francés R, Gutiérrez A, Juanola O (2021) Bacterial Translocation as Inflammatory Driver in Crohn's Disease. *Front Cell Dev Biol* 9:703310. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.703310/BIBTEX>
- Liu J, Tan L, Wang J, et al (2016) Complete biodegradation of chlorpyrifos by engineered *Pseudomonas putida* cells expressing surface-immobilized laccases. *Chemosphere* 157:200–207. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.05.031>
- Logsdon AF, Erickson MA, Rhea EM, et al (2018) Gut reactions : How the blood – brain barrier connects the microbiome and the brain. 159–165. <https://doi.org/10.1177/1535370217743766>
- Long-Smith C, O'Riordan KJ, Clarke G, et al (2020) Microbiota-gut-brain axis: New therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60:477–502. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023628>
- Long D, Liu M, Li H, et al (2021) Dysbacteriosis induces abnormal neurogenesis via LPS in a pathway requiring NF- κ B/IL-6. *Pharmacol Res* 167:105543. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105543>
- Lopes-Ferreira M, Maleski ALA, Balan-Lima L, et al (2022) Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. *Int J Environ Res Public Health* 19:. <https://doi.org/10.3390/ijerph19063198>
- Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- Ma TY, Nighot P, Al-Sadi R (2018) *Tight Junctions and the Intestinal Barrier*, Sixth Edit. Elsevier Inc.
- Maes E, Sadovskaya I, Lévêque M, et al (2019) Structure and biological activities of a hexosamine-rich cell wall polysaccharide isolated from the probiotic *Lactobacillus farciminis*. *Glycoconj J* 36:39–55. <https://doi.org/10.1007/S10719-018-09854-Y/FIGURES/10>
- Mao Q, Manservigi F, Panzacchi S, et al (2018a) The Ramazzini Institute 13-week pilot study

- on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on the microbiome. *Environ Heal*. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0394-x>
- Mao Q, Manservigi F, Panzacchi S, et al (2018b) The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on the microbiome. *Environ Heal* 17:. <https://doi.org/10.1186/S12940-018-0394-X>
- Marín-Padilla M (2012) The human brain intracerebral microvascular system: development and structure. *Front Neuroanat* 6:1–14. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2012.00038>
- Martín R, Rios-Covian D, Huillet E, et al (2023) Faecalibacterium: a bacterial genus with promising human health applications. *FEMS Microbiol Rev* 47:fuad039. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAD039>
- Martins-gomes C, Coutinho TE, Silva TL, et al (2022) Neurotoxicity Assessment of Four Different Pesticides Using In Vitro Enzymatic Inhibition Assays. *Toxics* 10:. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxics10080448>
- Matsuzaki R, Gunnigle E, Geissen V, et al (2023) Pesticide exposure and the microbiota-gut-brain axis. *ISME J* 17:1153–1166. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01450-9>
- Menaceur C, Hachani J, Dib S, et al (2023) Highlighting In Vitro the Role of Brain-like Endothelial Cells on the Maturation and Metabolism of Brain Pericytes by SWATH Proteomics. *Cells* 12:1010. <https://doi.org/10.3390/CELLS12071010/S1>
- Meng Z, Liu L, Yan S, et al (2020) Gut microbiota: a key factor in the host health effects induced by pesticide exposure. *J Agric Food Chem*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04678>
- Mir H-D (2018) Influence de l'indole produit par le microbiote intestinal sur les comportements émotionnels chez la souris. Université Paris Saclay
- Molly K, Vande Woestyne M, Verstraete W (1993) Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:254–258. <https://doi.org/10.1007/BF00228615>
- Morais LH, Schreiber HL, Mazmanian SK (2021) The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 19:241–255. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>
- Mostafalou S, Abdollahi M (2016) Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol*. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Mou Y, Du Y, Zhou L, et al (2022) Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. *Front Immunol* 13:1–25. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.796288>
- Nagpal R, Yadav H (2017) Bacterial translocation from the gut to the distant organs: An overview. *Ann Nutr Metab* 71:11–16. <https://doi.org/10.1159/000479918>
- Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, et al (2017) A guiding map for inflammation. *Nat Immunol* 18:826–831. <https://doi.org/10.1038/ni.3790>
- Nolan RJ, Rick DL, Freshour NL, Saunders JH (1984) Chlorpyrifos : Pharmacokinetics in Human Volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol* 15:8–15
- Nougadère A, Merlo M, Héraud F, et al (2014) How dietary risk assessment can guide risk

- management and food monitoring programmes: The approach and results of the French Observatory on Pesticide Residues (ANSES/ORP). *Food Control* 41:32–48. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.025>
- NPIC Chlorpyrifos Technical Fact Sheet by the National Pesticide Information Center. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html>. Accessed 5 Mar 2023
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19:1584–1596. <https://doi.org/10.1038/NM.3407>
- Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ (1977) A Study of The Large Apparent Work of the Blood-Brain Barrier: the Mitochondrial Content of Capillary Endothelial Cells in Brain and Other Tissues of the Rat
- Oliphant K, Allen-Vercoe E (2019) Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. *Microbiome* 2019 71 7:1–15. <https://doi.org/10.1186/S40168-019-0704-8>
- Onchoi C, Kongtip P, Nankongnab N, et al (2020) Organophosphates in meconium of newborn babies whose mothers resided in agricultural areas of thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 51:77–87
- Parran DK, Magnin G, Li W, et al (2005) Chlorpyrifos alters functional integrity and structure of an in vitro BBB model: Co-cultures of bovine endothelial cells and neonatal rat astrocytes. *Neurotoxicology* 26:77–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2004.07.003>
- Perdijk O, Baarlen P Van, Fernandez-gutierrez MM, Brink E Van Den (2019) Sialyllactose and Galactooligosaccharides Promote Epithelial Barrier Functioning and Distinctly Modulate Microbiota Composition and Short Chain Fatty Acid Production In Vitro. *Front Immunol* 10:1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00094>
- Perez-Fernandez C, Morales-Navas M, Guardia-Escote L, et al (2020) Long-term effects of low doses of Chlorpyrifos exposure at the preweaning developmental stage: A locomotor, pharmacological, brain gene expression and gut microbiome analysis. *Food Chem Toxicol* 135:110865. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110865>
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R (2020) The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *J Exp Med* 217:1–16. <https://doi.org/10.1084/jem.20190062>
- Qin YQ, Wang LY, Yang XY, et al (2023) Inulin: properties and health benefits. *Food Funct* 14:2948–2968. <https://doi.org/10.1039/D2FO01096H>
- Quigley EMM (2019) Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clin Gastroenterol Hepatol* 17:333–344. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2018.09.028>
- Ramirez-Farias C, Slezak K, Fuller Z, et al (2008) Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *Br J Nutr* 101:541–550. <https://doi.org/10.1017/S0007114508019880>
- Rathod AL, Garg RK (2017) Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *J Forensic Leg Med* 47:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.02.003>
- Réquilé M, González Alvarez DO, Delanaud S, et al (2018) Use of a combination of in vitro models to investigate the impact of chlorpyrifos and inulin on the intestinal microbiota and the permeability of the intestinal mucosa. *Environ Sci Pollut Res* 25:22529–22540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2332-4>
- Reygner J, Condette CJ, Bruneau A, et al (2016a) Changes in composition and function of

- human intestinal microbiota exposed to chlorpyrifos in oil as assessed by the SHIME® model. *Int J Environ Res Public Health* 13:. <https://doi.org/10.3390/ijerph13111088>
- Reygner J, Lichtenberger L, Elmhiri G, et al (2016b) Inulin supplementation lowered the metabolic defects of prolonged exposure to chlorpyrifos from gestation to young adult stage in offspring rats. *PLoS One* 11:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164614>
- Ribeiro G, Ferri A, Clarke G, Cryan JF (2022) Diet and the microbiota – gut – brain-axis : a primer for clinical nutrition. *Clin Nutr* 0: <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000874>
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al (2019) What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7:. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7010014>
- Rizzi E, Deligne C, Dehouck L, et al (2021) A Triple Culture Cell System Modeling the Human Blood-Brain Barrier. *J Vis Exp* 2021:1–15. <https://doi.org/10.3791/63134>
- Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S (2020) Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv. Nutr.* 11:77–91
- Rose EC, Odle J, Blikslager AT, Ziegler AL (2021) Probiotics, prebiotics and epithelial tight junctions: A promising approach to modulate intestinal barrier function. *Int J Mol Sci* 22:. <https://doi.org/10.3390/ijms22136729>
- Round JL, Mazmanian SK (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009 9:313–323. <https://doi.org/10.1038/nri2515>
- Ruan W, Engevik MA, Spinler JK, Versalovic J (2020) Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Dig Dis Sci* 65:695–705. <https://doi.org/10.1007/S10620-020-06118-4>
- Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F (2020) The Gut-Brain Axis : How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol* 11:1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604179>
- Sabzevari S, Hofman J (2022) A worldwide review of currently used pesticides’ monitoring in agricultural soils. *Sci Total Environ* 812:152344. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152344>
- Saint-Pol J, Gosselet F, Duban-Deweir S, et al (2020) Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles. *Cells* 9:1–13. <https://doi.org/10.3390/cells9040851>
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, et al (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson’s Disease. *Cell* 167:1469-1480.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.018>
- Sancho J V, Pozo OJ (2000) Direct determination of chlorpyrifos and its main serum and urine by coupled-column liquid chromatography / electrospray-tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1490:1485–1490
- Santhiravel S, Bekhit AEDA, Mendis E, et al (2022) The Impact of Plant Phytochemicals on the Gut Microbiota of Humans for a Balanced Life. *Int J Mol Sci* 23:. <https://doi.org/10.3390/IJMS23158124>
- Saunders NR, Dziegielewska KM, Møllgård K, Habgood MD (2015) Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci* 9:. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00385>

- Saunders NR, Habgood MD, Møllgård K, Dziegielewska KM (2016) The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Research* 5:F1000 Faculty Rev-313. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7378.1>
- Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM (2012) Barrier Mechanisms in the Developing Brain. *Front Pharmacol* 3:46. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2012.00046>
- Schoultz I, Keita Å V. (2020) The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells* 9:1–30. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Sevin E, Dehouck L, Fabulas-da Costa A, et al (2013) Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:334–339. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.07.004>
- Sevin E, Dehouck L, Versele R, et al (2019) A Miniaturized Pump Out Method for Characterizing Molecule Interaction with ABC Transporters. *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 5529 20:5529. <https://doi.org/10.3390/IJMS20225529>
- Shaffo FC, Grodzki AC, Schelegle ES, Lein PJ (2018) The Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos Induces Sex-Specific Airway Hyperreactivity in Adult Rats. *Toxicol Sci* 165:244–253. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFY158>
- Sharma T, Sirpu Natesh N, Pothuraju R, et al (2023) Gut microbiota: a non-target victim of pesticide-induced toxicity. *Gut Microbes* 15:2187578. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2187578>
- Sheng W, Ji G, Zhang L (2023) Immunomodulatory effects of inulin and its intestinal metabolites. *Front Immunol* 14:1224092. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1224092/BIBTEX>
- Shimizu F, Sano Y, Abe M aki, et al (2011) Peripheral nerve pericytes modify the blood–nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol* 226:255–266. <https://doi.org/10.1002/JCP.22337>
- Smith L, Klément W, Dopavogui L, et al (2020) Perinatal exposure to a dietary pesticide cocktail does not increase susceptibility to high-fat diet-induced metabolic perturbations at adulthood but modifies urinary and fecal metabolic fingerprints in C57Bl6 / J mice. *Environ Int* 144:106010. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106010>
- Smith LM, Parr-Brownlie LC (2019) A neuroscience perspective of the gut theory of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 49:817–823. <https://doi.org/10.1111/ejn.13869>
- Spadoni I, Pietrelli A, Pesole G, Rescigno M (2016) Gene expression profile of endothelial cells during perturbation of the gut vascular barrier. *Gut Microbes* 7:540–548. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1239681>
- Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, et al (2015) A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science* 350:830–834. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD0135>
- Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF (2014) Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes, Brain Behav* 13:69–86. <https://doi.org/10.1111/gbb.12109>
- Suganya K, Koo B (2020) Gut – Brain Axis : Role of Gut Microbiota on Neurological Disorders and How Probiotics / Prebiotics Beneficially Modulate Microbial and Immune Pathways to Improve Brain Functions. *Int J Mol Sci*
- Šuligoj T, Vigsnaes LK, Van den Abbeele P, et al (2020) Effects of human milk

- oligosaccharides on the adult gut microbiota and barrier function. *Nutrients* 12:1–21. <https://doi.org/10.3390/nu12092808>
- Sun J, Wang F, Hu X, et al (2018) *Clostridium butyricum* Attenuates Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depressive-Like Behavior in Mice via the Gut-Brain Axis. *J Agric Food Chem* 66:8415–8421. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B02462>
- Supreeth M, Raju N (2017) Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:5961–5971. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8401-7>
- Suriyo T, Tachachartvanich P, Visitnonthachai D, et al (2015) Chlorpyrifos promotes colorectal adenocarcinoma H508 cell growth through the activation of EGFR/ERK1/2 signaling pathway but not cholinergic pathway. *Toxicology* 338:117–129. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.10.009>
- Takiishi T, Ideli C, Fenero M, et al (2017) Intestinal barrier and gut microbiota : Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* 5:1–12. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>
- Tang Q, Tang J, Ren X, Li C (2020) Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats. *Environ Pollut* 261:114129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>
- Tang WHW, Kitai T, Hazen SL (2017) Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ Res* 120:1183–1196. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309715>
- Thany SH, Reynier P, Lenaers G (2013) Neurotoxicité des pesticides Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? *Medecine/Sciences* 29:273–278. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2013293013>
- Thursby E, Juge N (2017) Introduction to the human gut microbiota. *Biochem J* 474:1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Torres-Maravilla E, Holowacz S, Delannoy J, et al (2022) Serpin-positive *Bifidobacterium breve* CNCM I-5644 improves intestinal permeability in two models of irritable bowel syndrome. *Sci Rep* 12:1–14. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-21746-8/FIGURES/8>
- Tourneux P, Haraux E, Deguines C, Gondry J (2014) Cohorte MecoExpo : utilisation du méconium pour estimer l ' exposition in utero aux pesticides des nouveau-nés en Picardie *. *Rev Méd Périnat*. <https://doi.org/10.1007/s12611-014-0277-5>
- Ubaid ur Rahman H, Asghar W, Nazir W, et al (2021) A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Sci Total Environ* 755:. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142649>
- Uerlings J, Schroyen M, Willems E, et al (2020) Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells. *J Funct Foods* 67:103855. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103855>
- Valdes Ana M, Walter Jens, Segal Eran, Spector Tim D (2018) Role of the gut microbiota in nutrition and health
- Van de Wiele T, Van den Abbeele P, Ossieur W, et al (2015) The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *Impact Food Bioact Heal Vitro Ex Vivo Model* 305–317. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_27
- Van Den Abbeele P, Taminiau B, Pinheiro I, et al (2018) Arabinoxylol-Oligosaccharides and Inulin Impact Inter-Individual Variation on Microbial Metabolism and Composition,

- Which Immunomodulates Human Cells. *J Agric Food Chem*.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04611>
- Van Melis LVJ, Heusinkveld HJ, Langendoen C, et al (2023) Organophosphate insecticides disturb neuronal network development and function via non-AChE mediated mechanisms. *Neurotoxicology* 94:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.11.002>
- Vancamelbeke M, Vermeire S (2017) The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 11:821–834.
<https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Varatharaj A, Galea I (2017) The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain Behav Immun* 60:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>
- Versele R, Corsi M, Fuso A, et al (2020) Ketone bodies promote amyloid- β 1–40 clearance in a human in vitro blood–brain barrier model. *Int J Mol Sci* 21:1–20.
<https://doi.org/10.3390/ijms21030934>
- Versele R, Sevin E, Gosselet F, et al (2022) TNF- α and IL-1 β Modulate Blood-Brain Barrier Permeability and Decrease Amyloid- β Peptide Efflux in a Human Blood-Brain Barrier Model
- Verstraeten S, Layec S, Auger S, et al (2024) *Faecalibacterium duncaniae* A2-165 regulates the expression of butyrate synthesis, ferrous iron uptake, and stress-response genes based on acetate consumption. *Sci Rep* 14:1–12. <https://doi.org/10.1038/S41598-023-51059-3/FIGURES/4>
- Veszelka S, Tóth A, Walter FR, et al (2018) Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: Gene expression and drug transport. *Front Mol Neurosci* 11:. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00166>
- Waligora-Dupriet AJ, Campeotto F, Nicolis I, et al (2007) Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *Int J Food Microbiol* 113:108–113.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2006.07.009>
- Wang G, Sun W, Pei X, et al (2021) Function Galactooligosaccharide pretreatment alleviates damage of the intestinal barrier and inflammatory responses in LPS-challenged mice †. 12:1569–1579. <https://doi.org/10.1039/d0fo03020a>
- Wang L, Wang Z, Lan Y, et al (2023) Inulin Attenuates Blood-Brain Barrier Permeability and Alleviates Behavioral Disorders by Modulating the TLR4/MyD88/NF- κ B Pathway in Mice with Chronic Stress. *J Agric Food Chem* 71:13325–13337.
https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C03568/ASSET/IMAGES/LARGE/JF3C03568_0007.JPEG
- Weis GCC, Assmann CE, Mostardeiro VB, et al (2021) Chlorpyrifos pesticide promotes oxidative stress and increases inflammatory states in BV-2 microglial cells: A role in neuroinflammation. *Chemosphere* 278:130417.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130417>
- Wongkrasant P, Pongkorpsakol P, Ariyadamrongkwan J, Muanprasat C (2020) Biomedicine & Pharmacotherapy Original article A prebiotic fructo-oligosaccharide promotes tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPK-dependent pathway. *Biomed Pharmacother* 129:110415. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110415>
- Wright RO (2017) Environment , susceptibility windows , development , and child health. *Curr Opin Pediatr* 211–217. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000465>

- Yadav IC, Devi NL (2017) Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. Studium Press LLC, USA
- Yang F, Li J, Pang G, et al (2019) Effects of diethyl phosphate, a non-specific metabolite of organophosphorus pesticides, on serum lipid, hormones, inflammation, and gut microbiota. *Molecules* 24:21–23. <https://doi.org/10.3390/molecules24102003>
- Yano JM, Yu K, Donaldson GP, et al (2015) Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell* 161:264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>
- Zaragoza R (2020) Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier. *Front Physiol* 11:570922. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.00973/BIBTEX>
- Zhang D, Ding W, Liu W, et al (2023a) Single and Combined Effects of Chlorpyrifos and Glyphosate on the Brain of Common Carp: Based on Biochemical and Molecular Perspective. *Int J Mol Sci* 24:. <https://doi.org/10.3390/ijms241612934>
- Zhang D, Jian YP, Zhang YN, et al (2023b) Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Commun Signal* 2023 21:1–20. <https://doi.org/10.1186/S12964-023-01219-9>
- Zhang S, Gan L, Cao F, et al (2022) The barrier and interface mechanisms of the brain barrier, and brain drug delivery. *Brain Res Bull* 190:69–83. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2022.09.017>
- Zhao Y, Zhang Y, Wang G, et al (2016) Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere* 153:287–293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.055>
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic B V. (2015) Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163:1064. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.10.067>
- Zheng Z, Zong Y, Ma Y, et al (2024) Glucagon-like peptide-1 receptor: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2024 9:1–29. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01931-z>
- (2024) Pesticides use and trade, 1990–2022. FAO. <https://doi.org/10.4060/CD1486EN>
- (2023) Le glyphosate autorisé pour dix années supplémentaires dans l’UE par la Commission européenne. *Le Monde*

Résumé

Avec l'utilisation croissante des produits phytosanitaires, l'exposition de la population aux résidus de pesticides est en hausse dans le monde, particulièrement dans la région agricole des Hauts-de-France, malgré les réglementations limitant leur utilisation. Les études épidémiologiques et expérimentales ont souligné que l'exposition à une alimentation déséquilibrée contenant des résidus de pesticides, pendant la période périnatale, crée un environnement à risque pour la femme enceinte et le nouveau-né. Cela entraîne des maladies chroniques au cours de la croissance voire à l'âge adulte. Les barrières intestinale (BI) et hémato-encéphalique (BHE), qui limitent le passage des molécules délétères, sont particulièrement exposées. Le microbiote intestinal (MI) joue un rôle clé dans la régulation de ces contaminants alimentaires. Des études animales récentes montrent que la dérégulation du MI par les pesticides altère la fonction de la BI et a des effets à long terme sur la BHE, en raison de la connexion bidirectionnelle entre ces 3 éléments : l'axe microbiote-intestin-cerveau. Cela soulève des questions sur les mécanismes par lesquels ces perturbations intestinales affectent la santé et le cerveau, et comment réduire les effets de ces xénobiotiques. Dans le but d'étudier les effets d'une exposition chronique aux pesticides, en particulier l'insecticide Chlorpyrifos (CPF), sur le MI et les conséquences sur la BI et la BHE, deux approches complémentaires ont été adoptées. La première est une étude *in vivo* de rates gestantes et leur descendance. La deuxième est une approche mécanistique combinant 3 modèles *in vitro* humains : le modèle SHIME® (Simulateur de l'écosystème microbien intestinal), un modèle de BI de cellules épithéliales Caco-2 et un modèle de co-culture de la BHE. Dans le but de contrer les effets des résidus de pesticides, une stratégie de prévention utilisant un prébiotique, l'inuline, a été mise en place. Les résultats montrent que l'exposition au CPF perturbe l'équilibre du MI (dysbiose intestinale), altérant la perméabilité de la BI et induisant une translocation bactérienne vers les organes stériles chez la rate gestante. Cette exposition perturbe également le profil d'expression des jonctions serrées et des molécules d'adhésion des microvaisseaux cérébraux chez la mère et la descendance. En parallèle, l'exposition chronique des modèles *in vitro* au CPF entraîne une dysbiose intestinale progressive dans le colon, marquée par l'augmentation des bactéries potentiellement pathogènes au détriment des bactéries bénéfiques. Une augmentation de la perméabilité de la BI associée à une translocation bactérienne, a été observée, mais pas pour la BHE. La supplémentation en inuline rétablit l'équilibre du MI et prévient les effets délétères du pesticide sur la BI et BHE.

Mots clés : Pesticides, prébiotiques, axe microbiote-intestin-cerveau, barrières, période périnatale, dysbiose intestinale, translocation bactérienne, perméabilité, modèle *in vivo* de rat, modèles *in vitro* humains

Abstract

With the increasing use of phytosanitary products, population exposure to pesticide residues is on the rise worldwide, particularly in the agricultural region of Hauts-de-France, despite regulations limiting their use. Epidemiological and experimental studies have highlighted that exposure to an unbalanced diet containing pesticide residues during the perinatal period creates a risky environment for pregnant women and newborns. This can lead to chronic diseases during growth and even into adulthood. The intestinal barrier (IB) and the blood-brain barrier (BBB), which limit the passage of harmful molecules, are particularly exposed. The gut microbiota (GM) plays a key role in regulating these food contaminants. Recent animal studies show that pesticide-induced dysregulation of the GM disrupts IB function and has long-term effects on the BBB, due to the bidirectional connection between these three elements: the gut microbiota-brain axis. This raises questions about the mechanisms through which intestinal disturbances affect health and the brain, and how to reduce the effects of these xenobiotics. To study the effects of chronic pesticide exposure, particularly the insecticide Chlorpyrifos (CPF), on the GM and its consequences on the IB and BBB, two complementary approaches were adopted. The first is an *in vivo* study of pregnant rats and their offspring. The second is a mechanistic approach combining three *in vitro* human models: the SHIME® model (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), a Caco-2 epithelial cell IB model, and a BBB co-culture model. To counter the effects of pesticides, a prevention strategy using the prebiotic inulin was implemented. The results showed that CPF exposure disrupts the balance of the GM (intestinal dysbiosis), altering IB permeability and inducing bacterial translocation to sterile organs in pregnant rats. This exposure also disrupts the expression profile of tight junctions and adhesion molecules in cerebral microvessels in both mothers and offspring. Additionally, chronic exposure of the *in vitro* models to CPF leads to a progressive intestinal dysbiosis in the colon, marked by an increase in potentially pathogenic bacteria at the expense of beneficial flora. An increase in IB permeability, associated with bacterial translocation, was observed, though not for the BBB. Inulin supplementation restores GM balance and prevents pesticide adverse effects on the IB and BBB.

Keywords: Pesticides, prebiotics, gut microbiota-brain axis, barriers, perinatal period, intestinal dysbiosis, bacterial translocation, permeability, rat *in vivo* model, *in vitro* human models