

Effets des polluants atmosphériques liés au trafic sur la neuroinflammation : conséquences possibles sur le développement et le fonctionnement cérébral

Agnès PETIT-PAITEL | paitel@ipmc.cnrs.fr

CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - UMR7275, Valbonne

Mots clés : **Autisme, cerveau, diesel, nanoparticules, neuroinflammation**

Les troubles du spectre autistique (TSA)* sont des désordres neurodéveloppementaux qui seraient causés par une association de susceptibilités génétiques et de facteurs environnementaux. Les infections virales et bactériennes subies par la mère durant sa grossesse sont un facteur de risque identifié des TSA. Ceci a fait émerger la théorie de « l'activation immunitaire maternelle » comme facteur favorisant les TSA chez l'enfant, et a mis en évidence le rôle du système immunitaire dans l'origine de ces troubles (1). L'activation de la microglie, cellules immunes du cerveau, par des agents infectieux ou des traumatismes, est à l'origine de l'établissement d'un état neuroinflammatoire* qui favoriserait l'apparition de troubles liés à l'autisme et des déficits cognitifs liés au vieillissement. Des études épidémiologiques ont établi un lien entre l'exposition prénatale à la pollution de l'air et l'augmentation des risques de TSA (2). En particulier, les particules d'échappement diesel (DEP), activent la microglie adulte de souris *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs du premier article ont montré que l'exposition prénatale des souris aux DEP induisait des désordres comportementaux liés à l'autisme* chez la descendance, en particulier chez les mâles. Ici, ils s'intéressent aux effets d'une telle exposition sur la microglie de souris mâles et femelles et montrent que l'exposition prénatale aux DEP affecte de manière durable la morphologie et la fonction de la microglie de manière dépendante de l'expression du récepteur TLR4*. Ces effets touchent particulièrement les mâles et pourraient contribuer à l'apparition de comportements liés à l'autisme. Dans le second article, les auteurs montrent qu'un traitement chronique par des nanoparticules liées au trafic automobile active les cellules gliales (microglie et astrocytes*) de rat en culture, de manière partiellement dépendante du TLR4. Le profil transcriptomique* obtenu présente des similitudes avec le profil inflammatoire induit par un traitement au LPS*, composant de la paroi de certaines bactéries. Les polluants de l'air liés au trafic pourraient donc être à l'origine de l'établissement d'un état neuroinflammatoire néfaste pour le cerveau, chez l'embryon et chez l'adulte.

L'exposition gestationnelle à des polluants atmosphériques altère le volume cortical, la morphologie de la microglie et les interactions entre microglie et neurones de manière différente selon le sexe de la descendance

BOLTON JL. et al. (2017). Gestational exposure to air pollution alters cortical volume, microglial morphology, and microglia-neuron interactions in a sex-specific manner. *Front Synaptic Neurosci.*, 9 : p.10.

Résumé

La microglie assure la défense du cerveau contre les pathogènes et permet son développement normal en éliminant le surplus de synapses* et de neurones. De ce fait, des perturbations de la fonction microgliale à des stades précoces du développement pourraient avoir des conséquences importantes tout au long de la vie. Dans cet article, les auteurs étudient les conséquences d'une exposition *in utero* aux DEP sur le développement cérébral, la morphologie et les interactions entre microglie et neurones. Des souris gestantes reçoivent 5 doses de 50µg de DEP par

instillation pulmonaire à intervalles réguliers, entre les 2^{ème} et 16^{ème} jours de gestation. Sur les cerveaux d'embryons de 16 jours, les auteurs montrent que l'exposition prénatale aux DEP promeut un état proinflammatoire du cerveau en augmentant le ratio IL-1β/IL-10*. Cet effet n'est pas observé chez les souris transgéniques déficientes en récepteur TLR4. L'exposition aux DEP induit une augmentation du volume du cortex pariétal* et de l'hippocampe* et modifie la morphologie microgliale, de manière dépendante du TLR4, chez les mâles. L'analyse des cerveaux de souris mâles âgées de 30 jours révèle que l'exposition *in utero* aux DEP induit une diminution du volume du cortex pariétal et une augmentation du volume du corps cellulaire de la microglie dans le gyrus denté de l'hippocampe. Afin d'étudier les conséquences d'une activation du système immunitaire sur les paramètres observés, des souris reçoivent une injection intrapéritonéale de LPS, 2h avant leur sacrifice. Chez les animaux mâles ayant reçu DEP et LPS, la microglie dans le cortex pariétal présente une morphologie plus épaisse et longue que chez les souris contrôles traitées au LPS seul. A l'inverse, dans l'hippocampe, ce sont les femelles traitées aux DEP et LPS qui ont une microglie plus fine et longue que les souris contrôlées traitée

au LPS seul. Le traitement prénatal aux DEP induit également une augmentation du recouvrement des corps cellulaires de la microglie et des neurones dans le cortex pariétal des animaux des deux sexes, mais de manière plus marquée chez les mâles. Globalement cette étude montre qu'une exposition prénatale aux DEP induit des modifications de la microglie, durables dans le temps, aboutissant à des modifications de la morphologie des cellules microgliales et à des interactions atypiques entre microglie et neurones, dans le cortex pariétal. De manière intéressante, ces effets sont plus marqués chez la descendance mâle, ce qui est en accord avec les études de prévalence des TSA chez l'Homme (3).

Commentaire

L'étiologie des TSA est multifactorielle. Parmi les facteurs de risque figurent l'exposition aux polluants environnementaux dont font partie les DEP et l'activation du système immunitaire maternel (4,5). Cet article s'intéresse au lien de causalité possible entre ces deux phénomènes. Ils montrent qu'une exposition prénatale aux particules issues de la pollution automobile modifie sur du long terme le phénotype microglial dans le cerveau de la descendance mâle. Si la question et les résultats sont incontestablement intéressants, quelques imprécisions ou erreurs méthodologiques sont toutefois à regretter. En effet, si la dose de DEP administrée reste cohérente par rapport aux données de la littérature (6), il est dommage que les auteurs n'aient pas justifié leur choix quant à la fréquence et la voie d'administration choisies. La critique majeure concerne le très petit nombre de souris sur lequel les expériences ont été réalisées et qui ne justifie absolument pas les tests statistiques utilisés. Enfin, l'étude reste strictement descriptive et ne démontre pas, *in fine*, que l'altération microgliale induite par les DEP est responsable de l'apparition d'un phénotype TSA. De même, l'hypothèse finale des auteurs suggérant que l'activation anormale de la microglie la rendrait moins efficace dans son rôle de phagocytose des cellules neurales surnuméraires au cours du développement reste entièrement à démontrer.

Implication du Toll-like receptor 4 dans les réponses inflammatoires gliales induites par la pollution atmosphérique, *in vitro* et *in vivo*

WOODWARD NC. et al. (2017). Toll-like receptor 4 in glial inflammatory responses to air pollution *in vitro* and *in vivo*. *J Neuroinflammation*, 14: p.84.

Résumé

La pollution de l'air aux particules fines liées au trafic automobile (TRAP) est associée chez l'Homme à un vieillissement cognitif accéléré et à un risque accru d'apparition de démences liées à l'âge (7). Dans le cerveau des rongeurs, l'exposition aux particules fines provoque une diminution des épines dendritiques* ainsi qu'une activation microgliale associée à une neuroinflammation (8). Dans cet article, les auteurs ont étudié les effets d'une exposition chronique aux particules ultrafines ($PM_{0.2} < 0.2 \mu m$, nPM) sur des cultures mixtes de cellules gliales de rat*. Ils ont comparé les effets obtenus à ceux induits par le LPS. Les cellules ont été exposées à 10 $\mu g/ml$ de nPM ou 100ng/ml de LPS pendant 48h puis une analyse transcriptomique par microarray a été réalisée. Les gènes clés et les réseaux impliqués dans les réponses gliales aux nPM et au LPS ont été identifiés par

analyse statistique (SAM)* et analyse des réseaux de co-expression génique*. L'analyse a révélé 530 ARN dont l'expression est modifiée à la fois par les nPM et le LPS. Des groupes de gènes co-exprimés ont été identifiés par comparaison avec la banque de données Gene Ontology*. Le traitement aux nPM induit notamment des signatures transcriptomiques communes à celles induites par le LPS, caractéristiques des voies de signalisation impliquant le facteur de transcription NF- κB *, le récepteur TLR4, la cascade JAK-STAT* et la sécrétion de cytokines*. Dans leur ensemble, les analyses ont permis d'identifier des voies intracellulaires mises en jeu après activation du récepteur TLR4, suggérant qu'il pourrait être un médiateur commun des réponses aux nPM et LPS. Afin de vérifier cela, les auteurs ont traité les cultures gliales mixtes avec des siRNA* dirigés contre le TLR4 afin de réduire son expression. Les augmentations de l'expression des cytokines proinflammatoires TNF α *, IL-1 β *, IL-6* and KC* induites par les nPM sont abolies ou réduites dans les cellules traitées aux siRNA dirigés contre TLR4. De plus, l'expression des ARNm impliqués dans la voie de signalisation du TLR4 dépendante de MyD88* est augmentée par le traitement aux nPM dans les cellules gliales. Enfin, les auteurs ont validé leurs résultats *in vivo*, en montrant que dans des hippocampes de cerveaux de souris exposées chroniquement aux nPM pendant 150h sur une période de 10 semaines, les expressions des gènes de la voie TLR4 étaient significativement augmentées.

Commentaire

L'hypothèse de cette étude, déjà testée auparavant (9), est que l'exposition aux nPM pourrait avoir une action pro-inflammatoire sur les cellules gliales. La neuroinflammation induite par les nPM induirait l'atrophie des neurites dans certaines zones du cerveau, dont l'hippocampe, favorisant ainsi la survenue de troubles cognitifs liés à l'âge. Par des analyses transcriptomiques, ils mettent en évidence que les voies intracellulaires mises en jeu présentent des similitudes avec celles provoquées par un traitement au LPS, composant de la paroi de certaines bactéries qui provoque l'activation du système immunitaire et une réaction inflammatoire. De manière intéressante, les auteurs suggèrent ainsi que le récepteur immun TLR4, présent sur les cellules gliales microgliales et astrocytaires, jouerait un rôle clé dans les réponses inflammatoires induites par les nPM. Il aurait été intéressant que les auteurs appuient leur hypothèse en isolant la microglie et les astrocytes à partir d'hippocampes de souris traitées par inhalation aux nPM et étudient la contribution respective de chaque type cellulaire dans la neuroinflammation ainsi induite.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La pollution atmosphérique aux particules fines constitue un véritable problème de santé publique dont on ne connaît pas encore toutes les conséquences. En dehors de ses effets néfastes sur le cœur, les poumons et sur le risque d'apparition de divers cancers, il apparaît désormais qu'elle affecterait également le développement et le fonctionnement du cerveau. L'article de Bolton et al. montre que l'exposition par inhalation aux DEP pendant la grossesse provoque chez la descendance une modification durable du phénotype de la microglie et de ses interactions avec les neurones. Ces résultats s'ajoutent à la littérature existante rapportant l'influence d'une exposition prénatale aux DEP sur l'apparition de comportements autistiques. L'article de Woodward et al. montre que les nanoparticules liées au trafic induisent l'activation pro-inflammatoire de cellules gliales *in vitro* et *in vivo*, suggérant que cela favoriserait l'apparition de troubles cognitifs sur le sujet âgé. De manière intéressante, les deux études révèlent le rôle déterminant joué par le récepteur immun TLR4 présent sur les cellules gliales dans ces phénomènes. En conclusion, ces deux études mettent donc en évidence la dangerosité des polluants de l'air issus du trafic sur le cerveau de l'embryon et du sujet adulte.

GENERAL CONCLUSION

*Air pollution with fine particles from traffic is a real public health problem, the consequences of which are not yet known. Apart from its toxic effects on the heart, the lungs and on the risk of the occurrence of various cancers, it now appears that it would also affect the development and functioning of the brain. The first paper shows that exposure by inhalation to DEP during pregnancy causes in the offspring a long-term modification of the microglia phenotype and its interactions with neurons. These results support the existing literature on the influence of prenatal exposure to DEP on the development of autistic behaviors. The second article demonstrates that nanoparticles resulting from air pollution induce pro-inflammatory activation of glial cells *in vitro* and *in vivo*, suggesting that this may favor the development of cognitive deficits on the elderly. Interestingly, both studies reveal the crucial role played by the TLR4 immune receptor present on glial cells in these phenomena. Overall, these two studies highlight the toxicity of air pollutants from traffic on the brain of both the embryo and the adult.*

Lexique

Astrocytes : cellules gliales du système nerveux central qui assurent un rôle de soutien et de structure, un rôle de capture des neurotransmetteurs au niveau des synapses et participent à la barrière hémato-encéphalique. Ils ont aussi un rôle de transport de molécules et d'approvisionnement des neurones en lactate.

Cortex pariétal : zone du cerveau chargée de l'attention et de la perception de l'espace dont l'activité serait modifiée chez certains autistes.

Cultures mixtes de cellules gliales : Cultures primaires de cellules issues de cerveaux de souris âgées de 3 jours. Elles contiennent des astrocytes et des cellules microgliales.

Cytokines : Petites protéines solubles impliquées dans la communication intercellulaire et la régulation de la fonction de certaines cellules.

Désordres comportementaux liés à l'autisme : Les personnes autistes souffrent fréquemment d'anxiété, de troubles de communication et d'interactions sociales et présentent des comportements stéréotypés. Chacun de ces comportements peut être évalué chez la souris par des tests comportementaux spécifiques.

Epines dendritiques : Excroissances de la membrane des dendrites du neurone (prolongements neuronaux, qui comprennent un axone et plusieurs dendrites par neurone), sièges des contacts synaptiques.

Gene ontology : Projet bio-informatique destiné à structurer la description des gènes et des produits géniques dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces.

Hippocampe : zone du cerveau localisée dans le lobe temporal, impliquée dans la mémoire et le repérage dans l'espace mais aussi dans la régulation de l'humeur et en particulier l'anxiété. Il comprend 3 zones : le subiculum, la corne d'Ammon (aires CA1, CA2 et CA3) et le gyrus denté.

IL-1 β : Interleukine 1 beta, cytokine pro-inflammatoire.

IL-6 et IL-10 : interleukine 6 ou 10, cytokine anti-inflammatoire.

JAK-STAT : Système de transduction de signal composé d'un récepteur, d'une janus kinase et d'une protéine de type STAT.

KC : Chimiokine pro-inflammatoire.

Lipopolysaccharide (LPS) : Composant de la paroi de certaines bactéries. Il est très couramment utilisé en recherche pour mimer une infection bactérienne. En se fixant sur le récepteur TLR4 présent à la surface de certaines cellules immunes, il promeut la libération de cytokines proinflammatoires.

Microglie : Cellules gliales du système nerveux central. Petites et fortement ramifiées, elles sont très mobiles et patrouillent en permanence avec leurs prolongements cellulaires le parenchyme cérébral. Fonctionnellement proches des macrophages périphériques, elles ont pour rôle d'assurer l'immunité du système nerveux et jouent également un rôle important dans la maturation des synapses. En réaction avec des changements dans leur environnement, les cellules microgliales peuvent adopter différents phénotypes d'activation et devenir des médiateurs de l'inflammation en sécrétant différentes cytokines et chimiokines.

MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Responses Gene 88): Protéine adaptatrice cytosolique qui joue un rôle central dans la réponse immunitaire innée et adaptative. Elle intervient dans une des voies de signalisation intracellulaire en aval du TLR4.

Neuroinflammation: Inflammation du système nerveux. L'inflammation aiguë suit habituellement une blessure et se caractérise par la production de molécules inflammatoires, une activation des cellules endothéliales, des dépôts de plaquettes et des œdèmes tissulaires. L'inflammation chronique correspond à l'activation durable des cellules gliales et le recrutement d'autres cellules immunitaires dans le cerveau. L'inflammation chronique est généralement associée à des maladies neurodégénératives.

NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): Complexe protéique qui contrôle la transcription de l'ADN, la production de cytokines et la survie cellulaire.

Profil transcriptomique : Le transcriptome est l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. La transcriptomique regroupe un ensemble de techniques permettant une analyse quantitative relative et qualitative des ARN.

SAM (Significance Analysis of Microarrays): Méthode d'analyse statistique permettant de définir si des changements de niveau d'expression de gènes sont statistiquement significatifs.

siRNA (small interfering RNA) : Petit ARN interférant qui se lie spécifiquement à une séquence d'ARN messager pour empêcher leur traduction en protéines.

Synapse : Zone fonctionnelle de transformation de l'influx nerveux entre un neurone et une cellule réceptrice. Les synapses chimiques sont de deux sortes : excitatrices lorsqu'elles amplifient le signal électrique, inhibitrices lorsqu'elles le réduisent. Une synapse chimique est composée de deux éléments fondamentaux : l'axone d'un neurone présynaptique, où se trouvent des vésicules contenant des neurotransmetteurs excitateurs (comme le glutamate) ou inhibiteurs (le GABA), et la région réceptrice d'un neurone postsynaptique. Cette région peut être une dendrite, un axone, ou bien un corps cellulaire, sur laquelle sont disposés des récepteurs spécifiques réagissant au neurotransmetteur.

TLR4 (Toll-like Receptor 4) : Récepteur transmembranaire présent sur les macrophages, les adipocytes mais aussi les cellules microgliales et astrocytaires. Le TLR4 reconnaît notamment les lipopolysaccharides bactériens et participe à la réponse immune innée. Son activation met en jeu deux voies de signalisation intracellulaires dont une dépendante de la protéine MyD88 (voir ci-dessous) aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB et à la production de cytokines proinflammatoires.

TNFα: Tumor Necrosis Factor α, cytokine pro-inflammatoire.

Troubles du spectre autistique: Regroupent les désordres neurologiques qui étaient connus sous les noms d'autisme, de syndrome d'Asperger, de trouble envahissant du développement non spécifié et de trouble désintégratif de l'enfance.

WGCNA (Weighted correlation network analysis) : Méthode d'exploration de données utilisée pour l'étude de réseaux biologiques basée sur des corrélations par paires entre variables.

Publications de référence

3 **Loomes R.** et al. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 56 : p.466-474.

4 **Costa LG.** et al. (2017). Developmental Neurotoxicity of Traffic-Related Air Pollution: Focus on Autism. *Curr Environ Health Rep.*, 4 : p.156-165.

6 **Bolton JL.** et al. (2012). Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J.*, 26 : p.4743-54.

7 **Ranft U.** et al. (2009). Long-term exposure to traffic-related particulate matter impairs cognitive function in the elderly. *Environ Res.*, 109 : p.1004-11.

8 **Block ML.** et al. (2009). Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci.*, 32 : p.506-16.

9 **Cheng H.** et al. (2016). Urban traffic-derived nanoparticulate matter reduces neurite outgrowth via TNFα in vitro. *J Neuroinflammation*, 13 : p.19.

Revue de la littérature

1 **Careaga M.**, Murai T., Bauman MD. (2017). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biol Psychiatry*, 81: p.391-401.

2 **Rossignol DA.**, Genuis SJ., Frye RE. (2014). Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl Psychiatry*, 4 : p.e360.

5 **Bilbo SD.**, Block CL., Bolton JL. et al. (2017). Beyond infection - Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Exp Neurol* 2017.

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt