



Etudes des effets neurodéveloppementaux induits par l'exposition périnatale à un pesticide, le glufosinate d'ammonium : de la neurogenèse au comportement

Ameziane Herzine

► To cite this version:

Ameziane Herzine. Etudes des effets neurodéveloppementaux induits par l'exposition périnatale à un pesticide, le glufosinate d'ammonium : de la neurogenèse au comportement. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Orléans, 2016. Français. NNT : 2016ORLE2008 . tel-01412669

HAL Id: tel-01412669

<https://theses.hal.science/tel-01412669>

Submitted on 8 Dec 2016

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.

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INEM UMR7355 CNRS ÉQUIPE Neurotoxicologie du développement

THÈSE présentée par : **Ameziane HERZINE**

soutenue le : **12 Mai 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Biologie moléculaire et cellulaire Spécialité Neurosciences

**Etudes des effets neurodéveloppementaux induits
par l'exposition périnatale à un pesticide, le
glufosinate d'ammonium
De la neurogenèse au comportement**

THÈSE

Dirigée par : Dr. MORTAUD Stéphane MCU, Université d'Orléans

Co-encadrée par : Dr. DUBOURG Céline MCU, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Pr. GUILLEMIN Gilles Professeur, Macquarie University, Australia

Dr. VILLEGIER Anne-Sophie PhD Chercheur en Neurotoxicologie, INERIS

JURY :

Pr. PICHON Chantal Professeur, Université d'Orléans

Pr. CHARDON Karen Professeur, Université d'Amiens (UPJV)

Dr. CALAS André-Guilhem PhD Chercheur en Neurosciences, IRBA

Pr. GUILLEMIN Gilles Professeur, Macquarie University, Australia

Dr. VILLEGIER Anne-Sophie PhD Chercheur en Neurotoxicologie, INERIS

Dr. DUBOURG Céline MCU, université d'Orléans

Dr. MORTAUD Stéphane MCU, université d'Orléans



ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

INEM UMR7355 CNRS ÉQUIPE Neurotoxicologie du développement

THÈSE présentée par :

Ameziane HERZINE

soutenue le : **12 Mai 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Biologie moléculaire et cellulaire Spécialité Neurosciences

Etudes des effets neurodéveloppementaux induits par l'exposition périnatale à un pesticide, le glufosinate d'ammonium

De la neurogenèse au comportement

THÈSE

Dirigée par : **Dr. MORTAUD Stéphane** MCU, Université d'Orléans

Co-encadrée par : **Dr. DUBOURG Céline** MCU, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Pr. GUILLEMIN Gilles Professeur, Macquarie University, Australia

Dr. VILLEGIER Anne-Sophie PhD Chercheur en Neurotoxicologie, INERIS

JURY :

Pr. PICHON Chantal Professeur, Université d'Orléans

Pr. CHARDON Karen Professeur, Université d'Amiens (UPJV)

Dr. CALAS André-Guilhem PhD Chercheur en Neurosciences, IRBA

Pr. GUILLEMIN Gilles Professeur, Macquarie University, Australia

Dr. VILLEGIER Anne-Sophie PhD Chercheur en Neurotoxicologie, INERIS

Dr. DUBOURG Céline MCU, université d'Orléans

Dr. MORTAUD Stéphane MCU, université d'Orléans



Remerciements

*“Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ;
elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.”*

Marcel Proust

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand MERCI aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

J'adresse en premier lieu mes remerciements aux membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail. Merci au *Professeur Gilles Guillemain* et au *Dr. Anne-sophie Villegier* pour avoir pris le temps d'être rapporteur de ce manuscrit, merci au *Professeur Karen Chardon* et au *Dr. André-Guilhem Calas* qui ont gentiment accepté d'être examinateur, et enfin je remercie le *Professeur Chantal Pichon* de participer elle aussi à la fin de mon aventure et pour son aide, ses encouragements, son soutien et la sympathie qu'elle m'a témoignée.

Je tiens à remercier *Dr. Valérie Quesniaux* pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et son soutien tout au long de mon parcours au laboratoire, pour la qualité de ses conseils, sa disponibilité et la confiance qu'elle m'a accordée.

Ce travail de thèse ne pourrait pas voir le jour sans la direction du meilleur directeur, le *Dr Stéphane Mortaud* (alias maître); et le meilleur encadrement du *Dr Céline Montécot-Dubourg*. Je tiens à leurs exprimer toute ma gratitude et mes plus sincères remerciements pour leur enthousiasme, leur humour, pour le temps qu'ils ont consacré à mes recherches. Faut dire que j'ai fait mes premiers pas avec le GLA pendant mon stage de M1 sous la direction de *Céline* alors que je n'étais qu'un bébé. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir su vous rendre disponible à tout moment. J'ai énormément évolué au cours de ce cursus et j'ai beaucoup appris. Merci pour votre patience et votre pédagogie. Merci pour vos critiques. Merci pour vos encouragements. Merci pour votre écoute. Juste un grand MERCI !!!

Je tiens ensuite à adresser une pensée particulière à tous les membres de l'équipe.

Par où commencer ?

Anthony Laugeray, tout d'abord un très très grand merci pour ton aide au quotidien, tes conseils (surtout pour nos interminables discussions sur la bonne utilisation des statistiques), ta curiosité, tes compétences, tes connaissances du comportement de la souris jusqu'à deviner ce qu'elle pense, ta rigueur scientifique, tout ça font de toi un chercheur dans l'âme, j'espère que tu resteras aussi passionné par la recherche tout au long de ta carrière.

Justyne Feat, qui a la lourde tâche de poursuivre le combat ... attends, je n'ai pas encore fini, t'aura le PC très bientôt. Je te confie les derniers aliquots du GLA et tu fais bien attention.

Arnaud Menuet, pour ton éternelle positivité, ton sens critique, tes questions subtiles et ta bonne humeur. Merci pour l'intérêt que tu manifestes à mon projet. Merci pour les différentes corrections. Merci pour tous les encouragements que tu procures à mon égard !

Oliver Perche, Merci pour tes encouragements, ton aide, merci pour les puces. Merci pour ta Rigueur et précision scientifique qui m'ont été d'une aide précieuse lors des manips et dans la rédaction de cette thèse.

Olivier Richard, Jaques Pichon, Maryvonne Ardourel, Sylvain Briault, Lekbir Baala, pour leur contribution, leur aide continue mais aussi pour leur sympathie.

Betty Hébert et Arnaud Pâris, j'ai beaucoup appris en travaillant à vos côtés. Merci pour vos réflexions scientifiques, merci de m'avoir conseillé, soutenu et critiqué dans mon travail. Merci de m'avoir épaulé dans les moments difficiles, merci également pour toutes les discussions et moments que nous avons partagés, pour votre écoute et vos conseils avisés.

Lucie Clarysse, j'admire ta personnalité et ton courage (il faut en avoir pour relier l'Espagne à vélo). Merci pour tes encouragements, ta franchise et merci pour ma voiture qui garde jusqu'à maintenant les traces de ton passage.

Rafaëlle Rossignol, toujours à 100 à l'heure, j'ai apprécié de travailler à tes côtés. Merci pour les différents coups de main, de western et de qPCR que t'a fait pour Neuropest.

David Laurenceau, merci d'avoir su être disponible, de m'avoir prodigué maints conseils, merci d'être tout le temps d'une humeur joviale et merci pour tes différents fonds d'écran.

Géraldine Dilhet, notre nouvelle experte en comportement, merci pour ta bienveillance (toujours là à se soucier des autres), merci d'arrêter de faire du rangement en Cancero (on ne retrouve plus rien !!).

Un grand merci au *Dr Thierry Gefflaut*, qui m'a accueilli durant une semaine dans son laboratoire de chimie à Clermont-Ferrand (Une très belle ville... je ne veux pas avoir de problèmes), pour m'avoir transmis la rigueur des chimistes et de m'avoir appris de passer de la biologie à de la pure chimie.

G4 : Noria, Manoussa et le grand Rafiou : *Noria*, dite la reine mère (elle est là mais elle ne sert strictement à rien... euuuh je veux dire qu'elle ne prend plus de décisions dans le G4). Ce que j'ai apprécié chez toi c'est ta diplomatie, ta façon de dire que le schéma du tablier de Rafiou est très bien mais il serait meilleur avec des petites modifs. *Manoussa*, Pardon pour toutes les blagues que j'ai pu te faire, je suis sûr que tu n'es pas rancunière. Merci pour les moments que j'ai passé avec toi, merci pour ton soutien et tes petits conseils et tes motivations sans cesse !! *Rafiou*, je ne te remercierai jamais assez. Merci de m'avoir donné de l'énergie quand mes batteries sont à plats (t'as toujours quelque chose à becqueter dans ton tiroir), merci pour les petits cadeaux que tu nous ramènes quand tu rentres de voyage. Enfin merci à vous trois, j'ai adoré organiser le BBQ de l'INEM avec vous !! Même-si ce n'était pas une chose facile à faire !!

Merci à nos stagiaires qui sont passés par notre équipe : *Eva, Sophie, Marion, Marine*, j'ai apprécié travailler avec vous.

Je tiens à remercier aussi tous les membres de L'INEM, *Bernard, François, Dieudo, Les Isabelle, Marc, Catherine, les deux Florence, Flora, Chloé, Suleyman, Quentin, Léa, Pauline, Corine, Tiffany, les Aurélie, Jessica, Julie, Louis, Nathalie...* Une pensée et un grand merci à tous les stagiaires qui sont passés par là, les « zonesixiens », *Marie-Laure* et tous les personnels de l'INEM et du TAAM. Merci à notre secrétaire, *Caroline* et à celles qui l'ont précédée : *Anne, Nadège et Bernadette*.

J'adresse mes remerciements à mes amis, *Masnsen, Nesrine* avec qui j'ai commencé le parcours de combattant (je me souviens de ce jour du 05 septembre 2010) et depuis on a parcouru du chemin... merci de répondre toujours présent !

Un grand merci à *Kim*, je ne te remercierai jamais assez. Tu as su rendre cette aventure beaucoup plus plaisante et grâce à toi j'ai pu encaisser les chocs, grâce à toi que j'ai tenu jusqu'au bout. Tu as toujours été là pour me remonter le moral, tu as toujours su rendre les moments difficiles en moments agréables.

Pour terminer enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, mes parents, mes frères et sœurs, et en particulier à ma maman qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes qu'on pourrait résoudre. Mon père qui m'a toujours soutenu tout au long de mon parcours. Malgré mon éloignement depuis de nombreuses années (trop), leur intelligence, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Est-ce un bon endroit pour dire ce genre de choses? Je n'en connais, en tous cas, pas de mauvais. Je vous aime.

!!! *Merci* !!!

Résumé

Le glufosinate d'ammonium (GLA) est un herbicide largement utilisé dans l'agriculture. Comme cela est le cas pour la plupart des pesticides, ses effets neurotoxiques et développementaux n'ont été que partiellement étudiés. L'exposition précoce des pesticides peut affaiblir la structure de base du développement du cerveau et provoquer des changements permanents conduisant un large éventail d'effets à long terme sur la santé et/ou sur le comportement. Mes travaux de thèse ont permis de montrer que l'exposition périnatale à de faibles doses de GLA induisait des perturbations de la neurogenèse et de la migration des neuroblastes au niveau de la zone sous ventriculaire vers les bulbes olfactifs. De plus l'analyse transcriptomique cérébrale montre une modification significative de l'expression de nombreux gènes responsables de la dynamique du cytosquelette impliqués dans la régulation de la migration des neuroblastes. Etant un analogue structural du glutamate, le GLA pourrait agir sur le cytosquelette via la modification de la polyglutamylation de la tubuline. Cette hypothèse expliquerait les altérations cellulaires observées. Par ailleurs, nous avons mis en évidence dans cette étude, des troubles du comportement des souris exposées semblables à ceux observables chez les modèles murins des « troubles du spectre autistique » (ASD-like).

Mots-clés : Glufosinate d'ammonium, Pesticide, Migration neuroblastique, SVZ, Neuro-développement, Polyglutamylation, Neurotoxicologie, Trouble du spectre autistique.

Abstract

Glufosinate ammonium (GLA) is one of the most widely used herbicide in agriculture. As for almost all pesticides, potential adverse effects of GLA have not been investigated in the brain developmental neurotoxicity perspective. Indeed, early pesticides exposure may weaken the developing brain and cause permanent brain alteration which could lead to a wide range of the lifelong effects on health and/or behavior. As an illustration, we showed that perinatal exposure to low doses of GLA induced behavioral defects in mice adulthood, characterized by many similarities with Autism Spectrum Disorders phenotype. My thesis deals with the molecular aspect of this perinatal GLA exposure. I demonstrated that GLA induced disturbances of proliferation and neuroblast migration from the subventricular zone to the olfactory bulbs. These defects were associated with significant change in the expression of many genes involved in neuroblast migration and cytoskeleton regulation as observed by brain transcriptome analysis. I showed that GLA act on the cytoskeleton through modification of polyglutamylation of tubulin which lead to cell division/migration disturbances and cell differentiation defect. My work thus provides a new molecular link between pre- and post-natal exposure to the herbicide GLA and the onset of ASD like phenotype later in life. It also raises the fundamental concerns about the ability of current safety testing to assess risks of pesticide exposure during critical developmental periods.

Keywords: Glufosinate ammonium, Pesticide, Neuroblasts migration, SVZ, Neuro-development, Polyglutamylation, Neurotoxicology, Autism Spectrum Disorder

Productions scientifiques

a) Liste des articles issus de mes travaux de thèse :

1) **Herzine A**, Laugeray A, Feat J, Menuet A, Richard O, Pichon J, Montécot-Dubourg C, Perche O, Mortaud S. *Perinatal exposure to glufosinate ammonium pesticide impairs neurogenesis and neuroblasts migration through cytoskeleton destabilization. Soumis dans Frontiers in Cellular Neuroscience.*

2) **Herzine A**, Feat J, Laugeray A, Perche O, Menuet A, Montécot-Dubourg C, Mortaud S. *Growth retardation and cytoskeleton alteration in C6 glioma cells induced by Glufosinate herbicide and its first metabolite. Article en cours de préparation.*

3) Laugeray A., **Herzine A**, Perche O, Hebert B, Richard O, Menuet A, Mazaud-Guittot S, Lesné L, Briault S, Jegou B, Pichon J, Montecot-Dubourg C, Mortaud. S, (2014). *Perinatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice. Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 8:390.pp doi: 10.3389/fnbeh.2014.00390

Liste des résumés indexés :

Herzine A, Laugeray A, Richard O, Montecot-Dubourg C, Mortaud S. *Neuroblasts disturbances induced by perinatal exposure to glufosinate ammonium. Toxicology Letters*, Volume 229, Supplement, 10 September 2014, Page S91.

Laugeray A, **Herzine A**, Perche O, Richard O, Menuet A, Mazaud-Guittot S, Lesne L, Briault S, Jegou B, Pichon J, Montecot-Dubourg C, Mortaud S. *Perinatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice. Toxicology Letters*, Volume 229, Supplement, 10 September 2014, Page S43.

b) Liste des articles annexes à mes travaux de thèse :

1) Calas AG, Perche O, Richard O, Perche A, Pâris A, Lauga F, **Herzine A**, Palomo J, Ardourel MY, Menuet A, Mortaud S, Pichon J and Montécot-Dubourg C. (2016). *Characterization of seizures induced by acute exposure to an organophosphate herbicide, glufosinate-ammonium. NeuroReport*, 2016 May 4;27(7):532-541.

2) Rossignol R, Ranchon-Cole I, Pâris A, **Herzine A**, Perche A, Laurenceau D, Bertrand P, Cercy C, Pichon J, Mortaud S, Briault S, Menuet A, Perche O. (2014). *Visual sensorial impairments in neurodevelopmental disorders: evidence for a retinal phenotype in fragile x syndrome. PLoS One.* 2014 Aug 25; 9(8):e105996.

Table des matières

REMERCIEMENTS

RESUME

ABSTRACT

TABLE DES MATIERES 2

LISTE DES FIGURES 6

LISTE DES TABLEAUX 8

ANNEXE..... 10

ABREVIATIONS 12

PREAMBULE 15

CONTEXTE ET BIBLIOGRAPHIE DU SUJET 21

LES PESTICIDES 21

1) GENERALITES SUR LES PESTICIDES 21

2) HISTORIQUE 21

3) CLASSIFICATION DES PESTICIDES 22

a) Classification des pesticides selon leur mode d'action 22

b) Classification des pesticides selon la structure chimique du principe actif..... 23

c) Classification des pesticides selon les espèces de ravageurs ciblés 24

4) LES HERBICIDES 24

5) SANTÉ ET PESTICIDES..... 25

a) Généralités 25

b) Les cancers 25

c) Les troubles de la reproduction 26

d) Les maladies neurologiques 26

6) LE GLUFOSINATE D'AMMONIUM (GLA) 27

a) Utilisation..... 27

b) GLA et OGMs..... 28

c) Structure et chimie du GLA..... 28

d) GLA & Métabolites..... 28

e) Action du GLA sur les plantes : inhibition de la glutamine synthétase 29

f) Toxicité du glufosinate d'ammonium..... 30

g) NOAEL et DJA 30

7) CONSEQUENCES PHYSIOLOGIQUES D'UNE EXPOSITION AU GLA 32

a) Données cliniques 32

b) Données expérimentales.....	32
8) CIBLES POTENTIELLES DU GLA	33
GLUFOSINATE D'AMMONIUM & GLUTAMATE	35
1) LE GLUTAMATE ET SES RECEPTEURS DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	35
2) LA SYNAPSE TRIPARTITE GLUTAMATERGIQUE	36
3) MATURATION POST TRADUCTIONNELLE ET GLUTAMATE	37
4) SYNTHÈSE ET MÉTABOLISME DU GLUTAMATE.....	40
PROBLÉMATIQUE	43
LE GLUFOSINATE D'AMMONIUM ET LA MIGRATION NEURONALE	47
1) INTRODUCTION	47
2) MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
a) Matériel biologique	49
b) Culture d'explants de la zone sous ventriculaire (SVZ) et du cervelet sur Matrigel®	50
c) Réalisation de coupes histologiques	51
d) Immunohistologie.....	51
e) Immunomarquage anti BrdU	52
f) Immunocytoologie.....	53
g) Marquage des cellules apoptotiques (marquage tunnel)	53
h) Extraction d'ARN totaux.....	53
i) Puce d'expression ou puce transcriptomique.	54
j) Observations microscopique	55
k) Analyses statistiques.....	56
3) RESULTATS.....	57
a) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la zone sous ventriculaire.....	57
b) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la prolifération dans la zone sous ventriculaire et la migration des neuroblastes vers les bulbes olfactifs	58
c) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la structure de la couche de cellules mitrales et la cyto-architecture des bulbes olfactifs.....	63
d) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la mort cellulaire programmée au niveau des bulbes olfactifs et dans la zone sous ventriculaire	66
e) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la migration des neuroblastes ex vivo sur Matrigel®	67
f) Analyse transcriptomique suite à l'exposition au glufosinate d'ammonium.....	70
4) DISCUSSION.....	75
a) Le glufosinate d'ammonium perturbe la migration des neuroblastes	75
b) Le glufosinate d'ammonium perturbe la formation des chaînes de neuroblastes	77

c)	<i>L'augmentation de la Reelin dans les bulbes, un système de compensation?</i>	78
d)	<i>Le glufosinate d'ammonium et le glutamate</i>	79
e)	<i>Le glufosinate d'ammonium et les perturbations transcriptomiques</i>	80
LE GLUFOSINATE D'AMMONIUM ET LE CYTOSQUELETTE		85
1)	INTRODUCTION	85
2)	MATERIEL ET METHODES	87
a)	<i>Culture cellulaire et traitement</i>	87
b)	<i>Mesure de la Cytotoxicité (test MTT)</i>	87
c)	<i>Immunocytologie</i>	88
d)	<i>Semi quantification des taux protéiques</i>	88
e)	<i>Observations microscopiques</i>	89
f)	<i>Analyses statistiques</i>	89
3)	RESULTATS	90
a)	<i>Co-localisation de la tubuline polyE avec l'α-tubuline</i>	90
b)	<i>Cytotoxicité du GLA</i>	90
c)	<i>Différenciation des cellules C6 et polyglutamylation</i>	91
d)	<i>Effets du glufosinate d'ammonium sur la croissance des C6</i>	93
e)	<i>Analyse semi-quantitative de la glutamine synthétase (GS)</i>	94
f)	<i>Analyse semi-quantitative des protéines impliquées dans le cytosquelette</i>	94
4)	DISCUSSION	98
LE GLUFOSINATE D'AMMONIUM ET LES CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES		103
1)	INTRODUCTION	103
2)	ARTICLE: PRE- AND POSTNATAL EXPOSURE TO LOW DOSE GLUFOSINATE AMMONIUM INDUCES AUTISM-LIKE PHENOTYPES IN MICE.	104
DISCUSSION GENERALE		149
1)	DU CYTOSQUELETTE AU COMPORTEMENT	150
2)	MODE, DOSE ET PERIODE D'EXPOSITION	152
a)	<i>Mode d'exposition</i>	152
b)	<i>Dose d'exposition</i>	154
c)	<i>Période d'exposition</i>	155
CONCLUSION GENERALE		157
PERSPECTIVES		159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		163
ANNEXE		187

Liste des figures

Figure 1 : Différentes Classifications des pesticides selon leur structure chimique.	23
Figure 2 : Schéma du métabolisme du glufosinate d'ammonium ou phosphinothricine (GLA ou PPT) chez les plantes sensibles et résistantes à ce pesticide.	29
Figure 3 : Réaction catalysée par la glutamine synthétase :	30
Figure 4 : La synapse tripartite glutamatergique.....	37
Figure 5 : La polyglutamylation de tubuline	38
Figure 6 : Représentation schématique des rôles de la polyglutamylation dans différents types de microtubules	39
Figure 7 : Schéma montrant une vue d'ensemble du métabolisme de la glutamine et le du glutamate dans les cellules de mammifères.....	40
Figure 8 : Procédure générale de l'étude.....	50
Figure 9 : Les différentes étapes du protocole de réalisation des puces d'expression.	56
Figure 10 : Effet de l'exposition périnatale au glufosinate d'ammonium sur la migration des neuroblastes le long du courant rostral.	58
Figure 11 : Suivi de la migration des neuroblastes in vivo avec un marquage au BrdU	62
Figure 12 : Effet de l'exposition périnatale au glufosinate d'ammonium sur la couche de cellules mitrales dans le bulbe olfactif.....	64
Figure 13 : Effet de l'exposition périnatale au glufosinate d'ammonium sur la Cyto-architecture des bulbes olfactifs	65
Figure 14 : Marquage des cellules apoptotiques dans la SVZ et les bulbes olfactifs	67
Figure 15 : Culture Ex vivo d'explants de la SVZ sur Matrigel® de souris exposées en périnatal.....	69
Figure 16 : Voies de signalisation impliquant le remodelage du cytosquelette	82
Figure 17 : Pourcentage de variation de quelques gènes qui sont impliqués dans l'organisation du cytosquelette	86
Figure 18 : Co-marquage α -tubuline et tubuline polyE	90
Figure 19 : Test de cytotoxicité du GLA sur les cultures de cellules C6	91
Figure 20 : Effets de la concentration du GLA sur la différenciation et la polyglutamylation des cellules C6	92
Figure 21 : Effets du GLA sur la croissance des cellules C6	93
Figure 22 : Effets du GLA (PPT) sur la quantité de GS dans les cellules C6.....	94
Figure 23 : Effets du GLA (PPT) sur la quantité de MAP2 dans les cellules C6	95
Figure 24 : Effets du GLA sur la localisation de MAP2 et β -caténine dans les cellules C6.....	97
Figure 25 : Le transport des agents administrés par voie intranasale pour le système nerveux central	154

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classement des pesticides selon l'organisme cible.....</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du GLA</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 3 : Différentes concentrations toxiques du GLA sur quelques espèces animales.....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 4 : Les différentes NOAEL du GLA sur quelques espèces animales.....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 6 : Liste des gènes dérégulés chez les GLA0.2 et GLA1 par rapport aux CTL.....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 7 : Molécules régulant la migration neuroblastique</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 8 : Les taux protéiques de différents acteurs du cytosquelette.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 9 : Liste des gènes impliqués dans des pathologies ASD dérégulés par l'exposition périnatale au GLA</i>	<i>188</i>

Annexe

<i>Analyse transcriptomique - database « ASD : Autism Spectrum Disorder »</i>	<i>187</i>
---	------------

Abréviations

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	GSEA : Gene Set Enrichment Analysis
AASQA : Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air	HRP : Horseradish peroxidase
AChE : Acétylcholine estérase	HSD : Hazardous Substances Databank
AMM : Autorisation de mise sur le marché	IPL : Internal plexiform layer
AMPA : Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate	IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
Ara-C : Cytosine- β -D-arabinofuranoside	JMPR : Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues
BCP : 1-bromo-2 chloropropane	LCR : Liquide céphalo-rachidien
BHE : Barrière hémato-encéphalique	MAPs : Protéines associées aux microtubules
BMP : Protéines morphogéniques osseuses	MCL : Mitral cell layer
BrdU : 5-bromo-2'-désoxyuridine	mGluR : Metabotropic glutamate receptor
BSA : Bovine serum albumin	MIA : Migration-inducing activity
CCP : Cytosolic carboxypeptidases	MPA : Acide 2-methylphosphinico-acétique
CDC : US Centers for Disease Control and Prevention	MPP : 3-methylphosphinico-acide propénoïque
Cpu : Caudate putamen	MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
CTL : Animaux ou échantillons contrôle	Nb : Neuroblastes
DAPI : 4',6'-diamidino-2- phénylindole	NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
DCX : Doublecortine	NO : Nitrogen oxide
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane	NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
DG : Gyrus denté	NRG : Neuregulines
DIV : Day in vitro	BO / OB : Bulbes olfactifs
DJA : Dose journalière admissible	OGM : Organisme Génétiquement Modifié
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ECL : Enhanced ChemiLuminescent	PCB : PolyChloroBiphényles
ECM : Matrice extracellulaire	PND : Postnatal day
EFSA : European Food Safety Authority	PolyE : Polyglutamylation de la tubuline
EGF : Epidermal growth factor	PPT : Phosphinothricine
EPA : US Environmental Protection Agency	Reln : Reelin
Eph : Ephrin Tyrosine Kinase	RMS : Courant rostral (rostral migratory stream)
EPL : External plexiform layer	SB : Sodium butyrate
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations	SDS : Sodium dodecyl sulfate
FC : Fold change	SGZ : Zone sous-granulaire
FGF : Fibroblast growth factor	SNC : Système Nerveux Central
GABA : Acide γ -aminobutyrique	SVF : Sérum de veau fœtal
GAPDH : Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	SVZ : Zone sous-ventriculaire (Subventricular zone)
GFAP : Glial fibrillary acidic protein	TBS : Tris buffer saline
GLA : Glufosinate d'ammonium	TED : Troubles Envahissant du Développement
GLA0.2 : Animaux ou échantillons exposés à 0.2mg/kg de GLA	TN-R : Ténascin-R
GLA1 : Animaux ou échantillons exposés à 1mg/kg de GLA	TSA : Troubles du Spectre Autistique
GLS : Glutaminase	TTLL : Tubuline Tyrosine Ligase Like
Glu : Glutamate	UNEP : United Nations environment programme
GLUK5 : Kainate receptor	USA : United States of America
GPL : Granular plexiform layer	VEGF : Vascular endothelial growth factor
GS : Glutamine Synthétase	VLDLR : Very Low Density Lipoprotein Receptor
	WHO : World Health Organization

Préambule

Préambule

Les pesticides sont utilisés en quantité considérable depuis plus d'un demi-siècle par l'agriculture intensive. Les conséquences de cette utilisation excessive sont notamment des contaminations importantes de l'eau et des aliments. Selon le ministère français de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, en 2012, 602 pesticides différents, dont 594 en métropole et 231 dans les départements d'outre-mer, ont été retrouvés sur les 2 706 points de mesure utilisés pour la surveillance de la qualité des cours d'eau. Ces pesticides posent un véritable problème de santé publique, non seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour la population générale du fait des effets possibles de faibles quantités de pesticides pendant de longues périodes. Les conséquences de ces pollutions semblent déjà se faire sentir.

Les personnes les plus fréquemment victimes d'intoxications par ces molécules sont bien-sûr les agriculteurs, qui manipulent et appliquent ces pesticides sur leurs cultures. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé depuis longtemps qu'il y a chaque année dans le monde 1 million de graves empoisonnements par les pesticides, avec quelques 220 000 décès (WHO.UNEP, 1989).

Des études épidémiologiques menées sur des populations exposées à ces toxiques semblent montrer un risque accru de cancers, de malformations congénitales dans la descendance directe, d'infertilité, de pathologies neurodégénératives, de déficiences mentales et de déficits immunitaires (Corsini et al., 2008; Lewis-Mikhael et al., 2015; Mamane et al., 2015; Wong et al., 2015). Les intoxications par les pesticides peuvent affecter le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique des animaux et de l'espèce humaine. Il est maintenant établi que les populations fortement exposées ont un risque plus important de développer des pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson (Chin-Chan et al., 2015). L'exposition au plomb, au mercure, aux polychlorobiphényles (PCB), à certains pesticides et autres neurotoxines environnementales contribue très probablement au problème, d'autant que l'intoxication à long terme est favorisée par le passage de ces composés dans le lait maternel (Anderson and Wolff, 2000). Par ailleurs, des études établissent le lien entre l'exposition aux pesticides et des cas d'infertilité-infécondité masculine ainsi qu'une augmentation du risque d'anomalies du développement de l'enfant, anomalies neuro-développementales et reproductives (Jegou et al., 1995;

Jeong et al., 2006). De même, les chiffres sont toujours en augmentation pour certaines génopathies neurodéveloppementales doit nous mener à nous interroger sur la possible existence de cas d'autisme/déficiences mentales liés à cette exposition. En effet, la fondation américaine « Autism Speaks » a fait état que l'augmentation de la prévalence d'autisme aux USA (1/88 enfants en 2012 et 1/50 en 2013) pouvait être considérée comme une augmentation de type épidémique, suggérant ainsi que, en plus des causes génétiques, des causes extrinsèques étaient impliquées.

Bien que les pesticides soient considéré comme essentiels pour l'industrie agricole moderne, l'utilisation de certains pesticides couramment utilisés a été remise en cause car directement associée à des développements neurologiques anormaux et altérés chez les enfants (Bouchard et al., 2010; Bouchard et al., 2011; Engel et al., 2007; Eskenazi et al., 2006; Grandjean et al., 2006; Guillette et al., 1998; Rauh et al., 2006; Ribas-Fito et al., 2006; Torres-Sanchez et al., 2007; Young et al., 2005). En outre, plusieurs liens ont été décrits entre les pesticides et les troubles du spectre autistique (TSA) (Roberts et al., 2007) et un diagnostic plus large de l'autisme et les troubles envahissant du développement (TED) (Eskenazi et al., 2007).

Il doit être noté également que bien qu'un comité d'experts de la "*National Academy of Sciences*" aux USA, ait conclu en l'an 2000 que 3 % de tous les troubles du développement présentés par les enfants américains sont la conséquence directe d'exposition aux toxines environnementales, aucune preuve expérimentale tangible ne démontrait clairement l'implication de pesticides dans ces troubles neuronaux.

Dans ce contexte extrêmement sensible, nous nous sommes interrogés sur les effets neurotoxiques d'un pesticide, composé actif d'un herbicide, le glufosinate d'ammonium (GLA). Cet herbicide est utilisé pour le contrôle des mauvaises herbes au niveau de certaines plantations (lentilles, fraises ...), des vergers et des vignes. Il est également utilisé pour le défanage de certaines cultures telles que les pommes de terre afin de faciliter leur récolte. Le GLA est également utilisé dans l'agriculture de plusieurs plantes OGM résistantes à ce pesticide comme le maïs (lignées T14 et T25), le riz (lignées LLRICE62), le soja (lignées A2704-12 et A5547-127), la betterave à sucre (lignées T120-7) (gouv.canada, 2015).

La cible du GLA chez la plante est la glutamine synthétase (GS). Son inhibition conduit à une accumulation d'ammoniac létale pour le végétal. Cette enzyme est

extrêmement conservée dans le monde vivant puisqu'on la retrouve chez les vertébrés où elle intervient, entre autre, au niveau du système nerveux central (SNC), dans l'homéostasie du glutamate, neurotransmetteur excitateur le plus répandu dans le cerveau.

L'ingestion de GLA, sous forme herbicide, involontaire ou lors de tentatives de suicides, peut provoquer des convulsions ainsi qu'une amnésie sévère (Watanabe and Sano, 1998). Chez la souris, une injection intra-péritonéale de GLA à forte dose (75 mg/kg) induit des crises d'épilepsie 4-5 heures après l'injection (Lapouble et al., 2002). Ces crises induisent une astrogliose généralisée qui pourrait traduire une réponse inflammatoire du SNC (Calas et al., 2016; Calas et al., 2008). Cependant, *in vivo*, la GS ne semble pas inhibée dans le cerveau chez l'adulte (Lapouble et al., 2002). La cible est donc probablement autre que cette enzyme, et peut être liée à l'analogie structurale du GLA avec le glutamate, il pourrait affecter différents systèmes impliquant le glutamate.

Cette perturbation probable, que ce soit au niveau d'une cible en particulier ou bien de toute la synapse glutamatergique, induit des troubles au niveau du cerveau ayant des conséquences comportementales et moléculaires. C'est dans ce contexte qu'il est apparu important d'étudier les effets de l'exposition chronique et périnatale à faibles doses au glufosinate d'ammonium sur le neurodéveloppement. C'est au cours de la période périnatale que les risques liés aux expositions aux xénobiotiques sont les plus élevés. En effet, pendant cette période, tous les organes se mettent en place et tout agent perturbant le bon déroulement de cette étape est potentiellement tératogène. De plus, les barrières, comme la barrière hémato-encéphalique (BHE), sont plus facilement perméables à tout composé susceptible d'être présent dans la circulation sanguine. Par ailleurs, lors d'une exposition aux pesticides au cours de la gestation, certains xénobiotiques ont la capacité de passer facilement la barrière placentaire. De même, ils peuvent se retrouver dans le lait maternel après la naissance et ainsi se retrouver dans la circulation sanguine des nouveaux nés et atteindre le SNC via l'allaitement (Anderson and Wolff, 2000). Il est donc nécessaire de connaître l'implication de ces toxiques dans la mise en place des maladies neuro-développementales afin de mieux les comprendre, de mieux sensibiliser les populations et plus largement de limiter l'impact des pesticides sur la santé publique.

Dans ce contexte extrêmement sensible, nous nous sommes intéressés aux effets neurotoxiques pendant cette période très critique du développement notamment

sur un phénomène clé du développement qui est la neurogenèse et la migration neuronale, du composé actif d'un pesticide à large spectre : le glufosinate d'ammonium.

Contexte et bibliographie du sujet

Contexte et bibliographie du sujet

LES PESTICIDES

1) Généralités sur les pesticides

Les pesticides sont des agents utilisés pour tuer ou contrôler les nuisibles indésirables, tels que les insectes, les mauvaises herbes, les rongeurs, les champignons, les bactéries ou d'autres organismes. Le terme "pesticide" comprend des insecticides, des herbicides, des rodenticides, ainsi que des désinfectants et des fumigènes. Ces composés ont un rôle vital dans le contrôle des ravageurs agricoles, industriels, dans les maisons et jardins. Parce qu'ils ont la capacité de réduire le niveau des maladies végétales à moindre coût, l'opinion publique a toléré leur utilisation (Aspelin, 1998). Toutefois, les avantages économiques et « sanitaires » ne sont pas sans risque potentiel avec de possibles effets néfastes sur la santé des humains, des animaux et de l'environnement. Il a été estimé que 85-90 % des pesticides appliqués en l'agriculture ne parviennent jamais à leur organisme cible, mais sont plutôt dispersés dans l'air, l'eau et le sol (Repetto and Baliga, 1996). Sur la base de ces estimations, l'exposition aux pesticides est hautement probable pour les organismes non-cibles.

2) Historique

Au cours des dernières décennies - essentiellement après la Seconde Guerre mondiale -, les pesticides sont devenus la forme la plus importante appliquée pour la gestion et le contrôle des ravageurs. Les pesticides de "première génération" étaient en grande partie des composés hautement toxiques, comme l'arsenic et le cyanure d'hydrogène. Leur utilisation a été largement abandonnée parce qu'ils étaient soit inefficaces, soit trop toxiques. Les pesticides de "deuxième génération" sont des composés organiques synthétiques qui ont vite remplacé ceux de la première génération.

La chimie de synthèse a progressé rapidement dans les années 1930 et au début des années 1940, une gamme de nouveaux pesticides a été élaborée, y compris les insecticides organochlorés comme le DDT. En 1937, les premiers composés

organophosphorés ont été synthétisés par un groupe de chimistes allemands. Ces composés très puissants ont été gardés secrets pendant la seconde guerre mondiale et ont été initialement développés comme agents potentiels de guerre chimique. Le pesticide qui a marqué l'histoire et qui a été utilisé par les forces armées américaines pendant la guerre du Vietnam pour défolier les jungles est bien sûr l'agent orange. Cet herbicide puissant (mélange de plusieurs composés) est suspecté de causer de graves problèmes de santé, dont le cancer. En outre, des dommages génétiques chez certaines personnes qui y ont été exposées ont conduit à des malformations congénitales chez leurs enfants. Après la guerre, ces composés organophosphorés ont été reconçus comme pesticides, et nombre d'entre eux continues à être utilisés aujourd'hui en plus des nouveaux pesticides plus efficaces.

3) Classification des pesticides

Un pesticide est une substance ou un mélange de substances utilisées pour prévenir, détruire, repousser ou atténuer toute espèce considérée comme nuisible. Un pesticide peut aussi être utilisé comme un défoliant ou un désinfectant. Plusieurs substances peuvent être utilisées comme pesticides : des agents chimiques, biologiques, antimicrobiens ou désinfectants. Un nuisible est un organisme vivant causant des dommages aux cultures, aux animaux d'élevage ou aux humains. Parmi les organismes dit nuisibles, on trouve des insectes, les pathogènes des plantes, les adventices, des mollusques, des oiseaux, des mammifères (rongeurs), des poissons, des nématodes et des microbes. Les pesticides sont classés en fonction de leur mode d'action, en fonction de leur structure chimique, ou encore en fonction de leurs organismes cibles.

a) Classification des pesticides selon leur mode d'action

Dans ce type de classement, les pesticides sont classés en fonction de la façon dont ils agissent pour obtenir l'effet désiré. De cette façon, les pesticides sont divisés en deux classes : les pesticides de contact (non systémiques) et les pesticides systémiques. Les pesticides non systémiques agissent juste au contact avec l'organisme cible et ne pénètrent que superficiellement les tissus d'où le nom de pesticide de contact. Des exemples de pesticides de contact sont le paraquat et diquat-

dibromide. Les pesticides systémiques quant à eux pénètrent efficacement les tissus de l'organisme cible et se déplacent à travers le système vasculaire pour provoquer l'effet désiré. Des exemples de pesticides systémiques comprennent le 2,4-D (un composé de l'agent orange), le glyphosate qui rentre dans la composition du Roundup® (Buchel, 1983) et le glufosinate d'ammonium (Basta®, liberty®). Selon cette classification, les rodenticides, les fumigènes sont aussi des pesticides systémiques.

b) Classification des pesticides selon la structure chimique du principe actif

Selon leur structure chimique, les pesticides sont répertoriés en différentes classes. Les plus répandus sont les organophosphorés, les organochlorés, les carbamates et les pyréthroïdes (Figure 1).

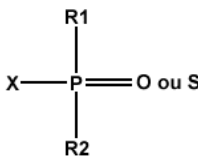
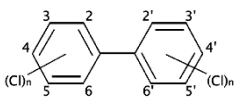
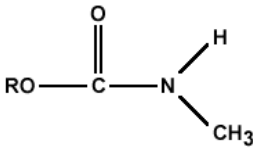
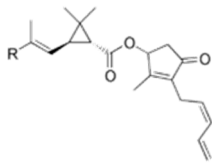
			
Les organophosphorés : - R1 et R2 sont des chaînes alkoxy ou aryloxy et X est un groupe aliphatique ou aromatique.	Les organochlorés : composés de synthèse, comportant au moins un atome de chlore. Structure du PCB	Les carbamates : méthylcarbamates dérivés de l'acide méthylcarbamique. R est une chaîne alkyl ou aryl.	Les pyréthroïdes : Dérivés de la pyréthrine, un pesticide d'origine naturelle.

Figure 1 : Différentes Classifications des pesticides selon leur structure chimique.

Les organophosphorés : Ce sont des composés organiques comportant au moins un atome de phosphore lié directement à un carbone. Dans cette famille de pesticides, on retrouve le glufosinate d'ammonium et le Chlorpyrifos.

Les carbamates : Ils affectent le système nerveux via une enzyme responsable de la régulation de l'acétylcholine (l'acétylcholinestérase). Le carbaryl et le carbofuran font partie des carbamates.

Les organochlorés : Ils ont été couramment utilisés dans le passé, mais beaucoup ont été retirés du marché en raison de leurs effets sur la santé et sur l'environnement ainsi que de leur persistance (par exemple le PCB, le DDT et le chlordane).

Les pyréthriinoïdes : Ils ont été développés comme une version synthétique de la pyréthrine, un pesticide d'origine naturelle, qui se trouve dans les chrysanthèmes. Ils ont été modifiés pour augmenter leur stabilité dans l'environnement comme la cyperméthrine ou la deltaméthrine. Ces pyréthroïdes synthétiques seraient toxiques pour le système nerveux en raison de leur cibles moléculaires (canaux ioniques) (Costa, 2015).

c) Classification des pesticides selon les espèces de ravageurs ciblés

Dans ce type de classement, les pesticides sont classés d'après le nom de la cible correspondante, comme indiqué dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Classement des pesticides selon l'organisme cible.	
Pesticides	Organismes cibles
Herbicides	Les végétaux
Insecticides	Les insectes
Rodenticides	Les rongeurs
Fongicides	Les champignons
Acaricides	Les arachnides
Bactéricides	Les bactéries
Virucides	Les virus
Algicides	Les algues

4) Les herbicides

Un herbicide est un pesticide utilisé pour tuer les plantes indésirables ou réduire la croissance des adventices. Ces pesticides sont utilisés dans différentes utilisations comme l'entretien des pâturages et le nettoyage des terrains vagues, les sites industriels, les chemins de fer et les voiries. Beaucoup d'entre eux se retrouvent dans la chaîne alimentaire.

Parmi les herbicides les plus utilisés dans le monde, on retrouve le glyphosate (Roundup®) (8000 tonnes / an en France). Mais, du fait de l'augmentation du nombre de plantes résistantes à ce dernier, un autre composé a été synthétisé en vue de son remplacement pour certaines cultures : le glufosinate d'ammonium.

5) Santé et pesticides

a) Généralités

Les effets des pesticides sur la santé dépendent du type du pesticide lui-même. Il peut être absorbé par différentes voies, telles que l'inhalation, l'ingestion et l'absorption cutanée. Des problèmes de santé peuvent survenir chez les travailleurs qui manipulent des pesticides, principalement les agriculteurs, tels que des douleurs abdominales, des vertiges, des maux de tête, des nausées, des vomissements, ainsi que des problèmes de peau et des yeux (Ecobichon, 1996). Certains pesticides peuvent affecter le système nerveux ou le système endocrinien. Ils peuvent être également cancérigènes. L'évaluation des risques pour la santé humaine est donc nécessaire pour de nombreux pesticides voire pour tous les pesticides même s'ils ont eu une autorisation de mise sur le marché (AMM). La difficulté de l'évaluation est en partie liée au fait que les effets des pesticides sur la santé peuvent être immédiats ou retardés suite à l'exposition (EPA, 2007).

Des études montrent d'autres conséquences néfastes de l'exposition aux pesticides, et notamment des problèmes neurologiques, des malformations congénitales, la mort fœtale (Sanborn et al., 2007), et des troubles neuro-développementaux (Jurewicz and Hanke, 2008).

b) Les cancers

De nombreuses études ont examiné les effets de l'exposition aux pesticides sur le risque de cancer. Des liens ont été trouvés entre exposition aux pesticides et des pathologies telles que les leucémies, lymphomes, tumeurs de cerveau, de rein, du sein, de la prostate, du pancréas, du foie, du poumon et les cancers de la peau (Gilden et al., 2010).

L'augmentation des taux de cancers a été trouvée parmi les ouvriers agricoles utilisant fréquemment ces produits chimiques (McCauley et al., 2006). L'exposition

d'une mère aux pesticides pendant la grossesse est également associée à une augmentation des risques d'apparition de leucémie, de tumeur de Wilms, et de cancer du cerveau de son enfant (Gilden et al., 2010; Van Maele-Fabry et al., 2010).

c) Les troubles de la reproduction

Les pesticides sont aussi responsables de nombreux effets sur la reproduction et la plupart d'entre eux sont des perturbateurs endocriniens. Des liens ont été établis entre exposition aux pesticides et des malformations congénitales et mort fœtale (Sanborn et al., 2007). Aux États-Unis, l'augmentation de ces anomalies est associée à la même période de l'année où les produits agrochimiques sont en concentrations les plus élevées dans les eaux de surface (Winchester et al., 2009). Il a également été constaté que les nouveau-nés exposés aux pesticides pendant le stade embryonnaire avaient un faible poids de naissance et des défauts de développement (Bretveld et al., 2006).

Un certain nombre de pesticides a été associé à des problèmes de la fertilité chez les hommes (Sheiner et al., 2003) : baisse de fertilité, altérations génétiques des spermatozoïdes et diminution de leur nombre (Figa-Talamanca et al., 2001; Recio-Vega et al., 2008).

d) Les maladies neurologiques

L'exposition aux pesticides peut causer une gamme d'effets sur la santé et notamment des effets neurologiques qui conduisent à des pertes de mémoire, de coordination, de vitesse de réponse à des stimuli réduite, de capacité visuelle réduite et de réduction de la motricité (Guillette et al., 1998; Quignot et al., 2011; Venerosi et al., 2009). Ces symptômes sont souvent très subtils et ne peuvent pas être reconnus par la communauté médicale comme un effet clinique.

Plusieurs études montrent des preuves liant l'exposition aux pesticides à des troubles neurologiques (Sanborn et al., 2007). Le risque de développer la maladie de Parkinson, reconnue comme maladie professionnelle chez les agriculteurs, est 70 % plus grand chez les personnes exposées même à des niveaux de pesticides très faibles (Ascherio et al., 2006). L'exposition chronique à long terme aux pesticides peut augmenter aussi les risques de démences (Baldi et al., 2011).

Les herbicides sont généralement considérés comme moins toxiques car la plupart interfèrent avec des hormones ou des enzymes végétales. Certaines de ces enzymes sont bien conservées et se retrouvent chez les mammifères. Le premier herbicide reconnu comme portant atteinte à la santé humaine est l'agent orange. Certains herbicides comme le paraquat ou le 2.4.D peuvent provoquer des troubles du système nerveux, tels qu'une neuropathie périphérique. Les premiers symptômes de cette maladie comprennent un engourdissement et des picotements dans les orteils et les doigts, se répandant progressivement pour inclure les mains et les pieds.

Récemment, Cattani et ses collaborateurs (2014) ont mené une étude qui consiste à exposer des rats, de façon aiguë ou bien en périnatal, au Roundup® (un herbicide à base de glyphosate). Cette exposition conduit à des niveaux de glutamate extracellulaire excessifs et, par conséquent, à une excitotoxicité du glutamate et à un stress oxydatif au niveau de l'hippocampe de ces rats. Par ailleurs, des déficits de la mémoire à court terme et des problèmes mentaux et émotionnels ont été associés à l'exposition à cet herbicide à base de glyphosate chez les enfants et les nouveau-nés (Cattani et al., 2014).

6) Le glufosinate d'ammonium (GLA)

a) Utilisation

Le glufosinate d'ammonium (GLA) ou également appelé phosphinothricine (PPT) est un composé actif de plusieurs herbicides commerciaux non sélectifs produit par Bayer CropScience™ comme le « Basta®, Finale®, Rely®, et Liberty® ».

Le glufosinate d'ammonium est très efficace et est utilisé pour contrôler les adventices dans plus de cent types de cultures dans 82 pays à travers le monde. Les agriculteurs comptent sur le glufosinate d'ammonium, car il est efficace contre un large éventail de mauvaises herbes.

Le GLA a été mis sur le marché en 1984. Aujourd'hui, il est homologué pour contrôler les mauvaises herbes dans plusieurs variétés de cultures dans le monde entier, y compris le soja, le maïs, la vigne, le colza et le coton, et bien d'autres qui ont été génétiquement modifiées permettant ainsi leur résistance à ce composé. Le GLA est utilisé aussi pour le défanage des cultures de pomme de terre pour faciliter leur récolte. Il est également utilisé pour le contrôle des mauvaises herbes au niveau des vergers et aussi le long des voiries. Etant un herbicide à large spectre, le glufosinate

d'ammonium agit contre un large éventail de mauvaises herbes. Cela inclut également en partie des mauvaises herbes devenues résistantes au glyphosate (Roundup®).

Le GLA a été dérivé à partir de la phosphinothricine, une toxine microbienne naturelle isolée dans de deux espèces de champignons *Streptomyces*.

b) GLA et OGMs

Il existe plusieurs plantes génétiquement modifiées (OGM) par introduction de gènes qui leur permet de résister à ce pesticide. Le gène code une enzyme, la phosphinothricin acétyl-transférase, (Hérouet et al., 2005) qui transforme le GLA ou PPT en NA-PPT. Cette réaction est décrite en figure 2. Actuellement, il existe plusieurs espèces et variétés de plantes de diverses cultures tolérantes au GLA comme le maïs, le coton, le riz, et le soja (gouv.canada, 2015). Ces plantes ont été largement cultivées aux Etats-Unis et au Canada pendant plusieurs décennies, sans aucune trace de l'effet négatif sur l'alimentation humaine ou animale selon Hérouet C. et ses collaborateurs (Herouet et al., 2005). Si cette étude ne démontre aucun effet de la plante transgénique sur la santé, qu'en est-il de cette plante une fois traitée au pesticide ou bien du pesticide lui-même ?

c) Structure et chimie du GLA

Le GLA est un analogue structural du glutamate. La structure du glutamate et du glufosinate d'ammonium et ses caractéristiques chimiques sont présentées dans le tableau 2.

d) GLA & Métabolites

Dans le sol, le glufosinate d'ammonium est dégradé par l'activité microbienne en 3-méthylphosphinico-acide propénoïque (MPP) et en acide 2-méthylphosphinico-acétique (MPA), et finalement en dioxyde de carbone dans des conditions aérobies sombres (EFSA, 2005; HSD, 2003) (figure 2).

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques du GLA

Structure du glutamate	$\text{HO}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\underset{\underset{\text{NH}_2}{ }}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\underset{\text{H}_2}{ }}{\text{C}}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{OH}$	
Structure du GLA	$\text{HO}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\underset{\underset{\text{NH}_2}{ }}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{P}}(\text{CH}_3)-\text{O}^{\ominus} \text{NH}_4^{\oplus}$	
Formule chimique du GLA	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{P}$; NH_4 .	
Masse moléculaire	198,16 g/mole.	
Densité	1.4 g/ml (à 20°C).	(Ahrens, 1994)
Stabilité	Hautement stable.	(Tomlin, 1997)
Solubilité	Eau : 1 370 000 mg/l (Hautement soluble dans l'eau)	

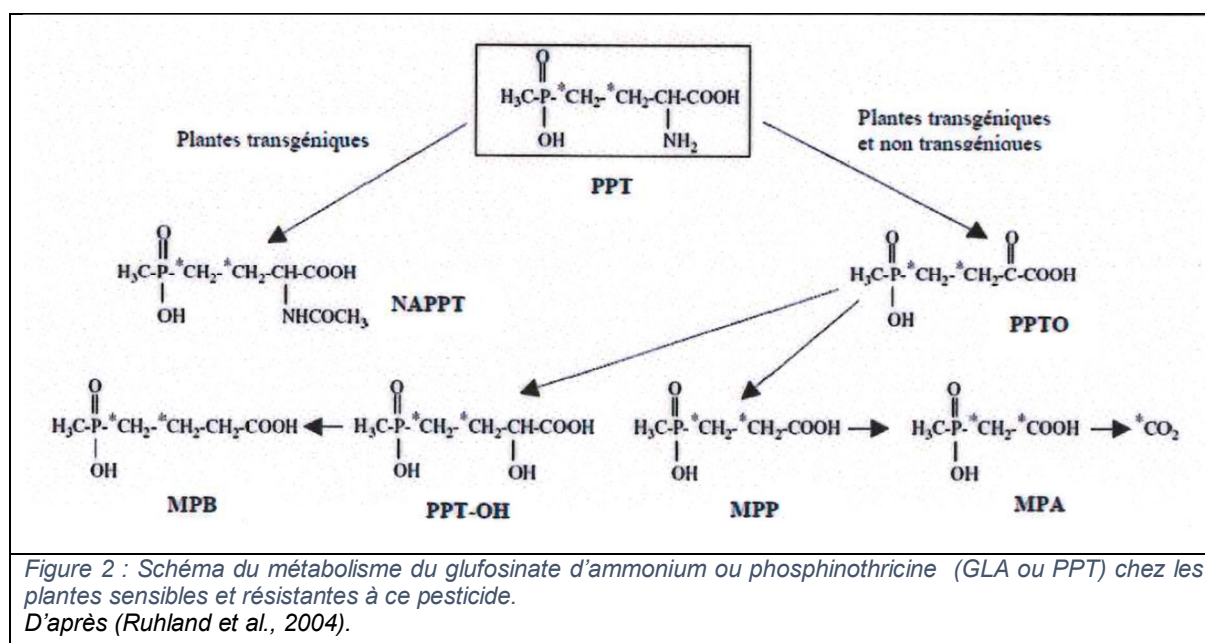
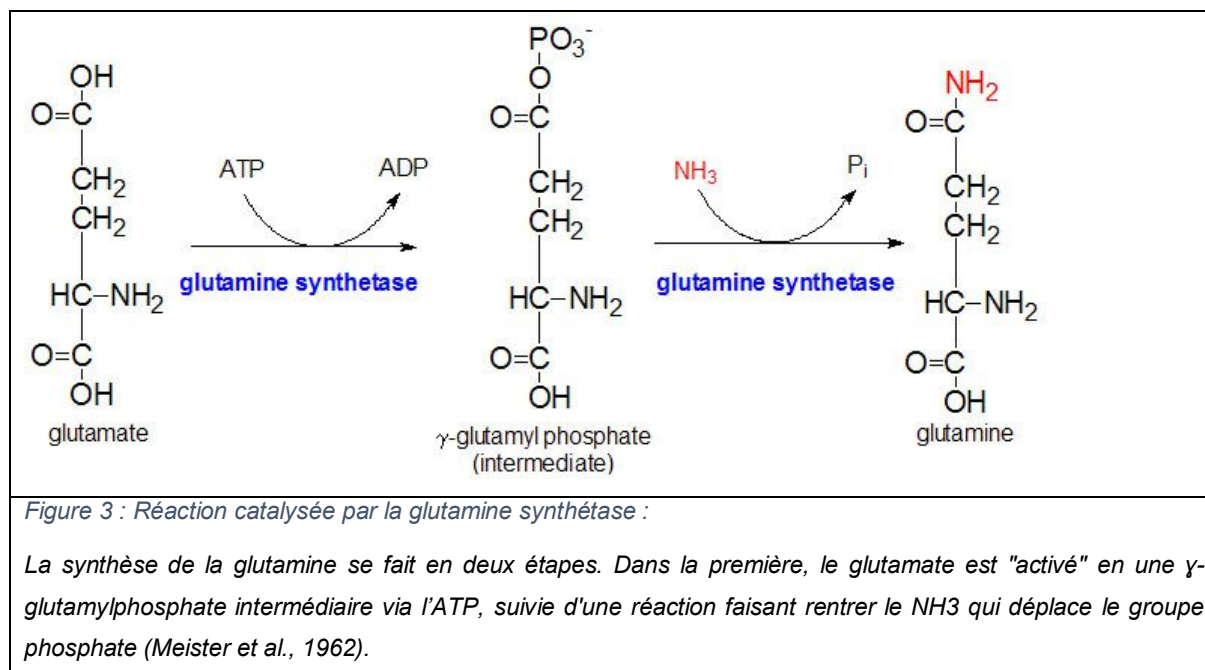


Figure 2 : Schéma du métabolisme du glufosinate d'ammonium ou phosphinothricine (GLA ou PPT) chez les plantes sensibles et résistantes à ce pesticide. D'après (Ruhland et al., 2004).

e) Action du GLA sur les plantes : inhibition de la glutamine synthétase

Le glufosinate d'ammonium est un herbicide non sélectif. La phosphinothricine (PPT), l'ingrédient actif de l'herbicide, est une phytotoxine naturelle et agit comme un puissant inhibiteur de la glutamine synthétase, responsable de l'assimilation de l'ammoniac dans les plantes via la synthèse de la glutamine à partir du glutamate

(figure 3) (Mifflin et al., 1981). L'inhibition de cette enzyme entraîne une accumulation d'ammoniac et une carence de plusieurs acides aminés, aboutissant finalement à la mort de la plante entière.



f) Toxicité du glufosinate d'ammonium

Le glufosinate d'ammonium est un analogue structural du glutamate. Le GLA agit comme un inhibiteur compétitif et irréversible de la glutamine synthétase, une enzyme essentielle chez les plantes. Cependant, la glutamine synthétase est également présente chez les mammifères dans de nombreux organes et notamment dans le système nerveux central (SNC).

Le tableau suivant montre les différentes concentrations toxiques sur quelques espèces animales (tableau 3).

g) NOAEL et DJA

La dose sans effet toxique observable ou NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) est le niveau d'exposition d'un organisme, constaté par l'expérience ou l'observation, pour lequel il n'y a pas d'effet indésirable statistiquement significatif dans la population exposée par rapport à son contrôle approprié (IUPAC, 2007). Elle correspond à la dose maximale de substance active qui, ingérée quotidiennement

durant toute la vie d'un animal sensible, n'entraîne pas l'apparition de symptômes délétères.

D'après les précédentes études menées sur le GLA, les NOAEL ont été calculées pour différentes espèces et sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 3 : Différentes concentrations toxiques du GLA sur quelques espèces animales

Toxicité		
LD50 Rat mâle par voie orale	2000 mg/kg	(Meister, 2002)
LD50 Rat (femelle) par voie orale	1620 mg/kg	
LD50 Souris mâle par voie orale	431 mg/kg	(Tomlin, 1994)
LD50 Souris (femelle) par voie orale	416 mg/kg	
LD50 Chien par voie orale	200-400 mg/kg	
LD50 Rat par voie dermale	>4000 mg/kg	(Meister, 2002)
LC50 Rat par inhalation	>0.62 mg/l air (aérosol)/4 h	(Tomlin, 1994)

Tableau 4 : Les différentes NOAEL du GLA sur quelques espèces animales

Espèce	NOAEL	
Souris	11 mg / kg / jour	(Meyer, 1991)
Rat	2.1 mg/kg / jour	
Lapin	6.3 mg/kg / jour	
Chien	1.5 mg/kg / jour	

La dose journalière admissible ou DJA est une mesure de la quantité d'un pesticide qui peut être ingérée (par voie orale) sur une base quotidienne sur une toute une vie entière sans risque pour la santé. Elle est généralement présentée en mg/kg/jour (WHO, 1987).

Le glufosinate d'ammonium a été précédemment évalué par la FAO et l'OMS sur les résidus de pesticides (JMPR) en 1991 et 1999. En 1999, Ces deux organisations ont décrété que la dose journalière admissible (DJA) est de 0,02 mg/kg de poids corporel. Cette dose est calculée sur la base de la NOAEL la plus faible, celle du rat à 2.1 mg/kg/jour, divisée par un facteur de sécurité de 100 (WHO, 2012).

7) Conséquences physiologiques d'une exposition au GLA

a) Données cliniques

Dans des conditions aiguës, le GLA a des effets neurotoxiques, comme en témoigne les symptômes neurologiques que présentent certains patients après une tentative de suicide par ingestion de grandes quantités d'herbicide contenant du GLA. L'empoisonnement par ingestion accidentelle ou suicidaire induit des complications neurologiques caractérisées par une perte de conscience, des convulsions, ou des troubles de la mémoire (Park et al., 2006). Watanabe & Sano ont décrit un cas d'un patient après une tentative de suicide par un herbicide à base de glufosinate d'ammonium. Le patient souffrait de troubles mentaux et de changements hématologiques ainsi que des problèmes gastro-intestinaux peu de temps après l'ingestion du poison. Plus tard, il a développé des convulsions généralisées, des troubles de la respiration et une insuffisance circulatoire. Lors de la récupération, le patient est exposé à des pertes de mémoire à court terme (Watanabe and Sano, 1998). D'autres patients ont présenté ces mêmes symptômes suite à une ingestion de GLA (Jeong et al., 2015; Moon and Chun, 2015).

b) Données expérimentales

Dans le modèle murin, le GLA peut causer des convulsions chez la souris après une injection aiguë de 75 mg/kg (Lapouble et al., 2002). Cette étude menée par Lapouble et ses collaborateurs, a montré une induction par le GLA de crises tonico-cloniques et des convulsions généralisées chez les souris. Les auteurs suggèrent que ces crises sont médiées par une activation des récepteurs glutamatergiques NMDA et la production de monoxyde d'azote (NO), sans inhibition de la glutamine synthétase cérébrale (Lapouble et al., 2002).

L'exposition directe du cerveau de rats à des doses aiguës de GLA provoque des altérations de la neurotransmission glutamatergique (Nakaki et al., 2000). L'administration chronique d'une dose modérée de GLA induit des déficits de la mémoire, des modifications structurales du cerveau, une activité astrogliale, et des perturbations de l'homéostasie du glutamate chez la souris adulte (Calas et al., 2008; Meme et al., 2009). Le GLA est toxique à l'âge adulte mais il pourrait l'être encore plus pendant le jeune âge et les premières phases du développement. En effet, il pourrait

passer les différentes barrières placentaires et hémato-encéphalique et causer ainsi des dommages au niveau cérébral.

Il a été montré aussi que le GLA est très toxique et létal pour les embryons et induit des défauts morphologiques (Watanabe and Iwase, 1996). L'exposition au GLA induit aussi une apoptose au niveau du neuro-épithélium dans des embryons de souris en culture (Watanabe, 1997).

Etant donné que le GLA perturbe probablement l'homéostasie du glutamate, tous les systèmes utilisant le glutamate sont susceptibles d'être vulnérables à une exposition à ce pesticide.

8) Cibles Potentielles du GLA

En raison de l'analogie structurale du GLA avec le glutamate, tout système et voie de signalisation impliquant le glutamate sont des cibles potentielles par une action directe ou indirecte du GLA. En effet, le glutamate est une molécule très abondante dans l'organisme. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires et dans de nombreux organes, notamment bien sûr au niveau du système nerveux central (SNC) où le glutamate est un neurotransmetteur majeur. On le retrouve à plusieurs niveaux, notamment au niveau de la synapse tripartite, des vésicules présynaptiques contenant le glutamate, des différents récepteurs et des différentes enzymes recyclant le glutamate. Le glutamate intervient aussi au niveau cellulaire et moléculaire où il joue un rôle important dans la stabilisation du cytosquelette via le mécanisme de polyglutamylation, essentiel pour la régulation de la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Le glutamate intervient aussi dans différentes voies métaboliques notamment au sein de la mitochondrie. Cette dernière est capable, à partir de la glutamine, de produire du glutamate ensuite transformé par la suite en α -céto-glutarate pris en charge dans le cycle de Krebs pour la production d'énergie.

Afin de mieux comprendre l'impact possible du GLA sur les différents aspects pouvant être affectés, il convient tout d'abord de les présenter plus en détail. Dans le deuxième chapitre, je détaillerai donc les mécanismes de la neurogenèse et de la migration neuronale afin de mieux appréhender les nombreux impacts possibles d'une exposition périnatale au GLA. Dans le troisième chapitre, j'y expliquerai les différentes implications moléculaires du glutamate.

Neurogenèse et cellules souches neurales

Glufosinate d'ammonium & glutamate

En raison de l'analogie structurelle du GLA au glutamate, il est nécessaire d'étudier ses effets sur les différents systèmes utilisant le glutamate chez les mammifères (Hack et al., 1994).

1) Le glutamate et ses récepteurs dans le système nerveux central

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le cerveau. Les connaissances sur la synapse glutamatergique ont énormément progressé au cours des 10 dernières années, principalement grâce à l'application de techniques de biologie cellulaire et moléculaire, d'électrophysiologie et à l'étude des récepteurs du glutamate et de ses transporteurs.

Il existe deux grandes familles de récepteurs au glutamate. Les récepteurs ionotropiques ou récepteurs-canaux et les récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G. Plusieurs types de récepteurs ionotropiques au glutamate ont été identifiés : les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA (canaux ioniques perméables aux ions sodium et, dans une moindre mesure, aux ions potassium) et les récepteurs kaïnate (leur activation entraîne une entrée massive des ions Na^+). Ces canaux sont nommés d'après les agonistes qui les activent : NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate), et l'acide kaïnique. L'activation de ces récepteurs produit toujours des réponses post-synaptiques excitatrices (Purves, 2001).

Les mGluRs constituent une famille de huit récepteurs couplés aux protéines G, divisés en trois groupes (Groupes I, II et III) selon une homologie de séquence et un profil de liaison de ligand (Amalric, 2015). Ils sont largement exprimés au niveau pré- et post-synaptique où ils régulent la transmission et la plasticité synaptique dans des conditions physiologiques par libération de Ca^{2+} .

Il existe également des transporteurs du glutamate sur les cellules gliales et neuronales. Cinq différents transporteurs du glutamate ont été identifiés chez les mammifères (Attwell, 2000; Masson et al., 1999; Meldrum, 2000). Les plus couramment exprimés dans le cerveau sont des GLT-1 / EAAT2 dans les cellules

gliales et EAAC1 / EAAT3 dans les neurones (Attwell, 2000; Masson et al., 1999; Smith, 2000).

Une fois dans les cellules gliales, le glutamate est métabolisé par la glutamine synthétase en glutamine ou en α -cétooglutarate par le glutamate déshydrogénase (Anderson and Swanson, 2000; Meldrum et al., 1999). La concentration extracellulaire de glutamate est normalement très faible ($\approx 1 \mu\text{M}$) (Anderson and Swanson, 2000; Attwell, 2000). Un excès de glutamate endogène peut contribuer à des lésions cérébrales aiguës et conduire à des conditions épileptiques.

2) La synapse tripartite glutamatergique

Le terme « synapse tripartite » est proposé pour décrire la communication entre les neurones et les astrocytes (Parpura et al., 1994). Cette synapse englobe un complexe présynaptique et post-synaptique, et un processus astrocytaire. Dans la synapse tripartite glutamatergique, on retrouve plusieurs sites régulateurs des taux de glutamate extracellulaire. Les processus physiologiques régissant le glutamate extracellulaire sont décrits dans la figure 4.

La GLA - s'il passe la BHE- pourrait donc perturber le bon fonctionnement de la synapse tripartite en agissant sur plusieurs niveaux, que ce soit au niveau de la glutamine synthétase qui convertit le glutamate en glutamine, ou bien au niveau de la glutaminase qui fait la réaction inverse. Le GLA pourrait ainsi bloquer ou activer les transporteurs du glutamate (VGLUT, EAAT, GLAST, GLT-1 et Xc) ou bien ses récepteurs (NMDA, mGluR, AMPA).

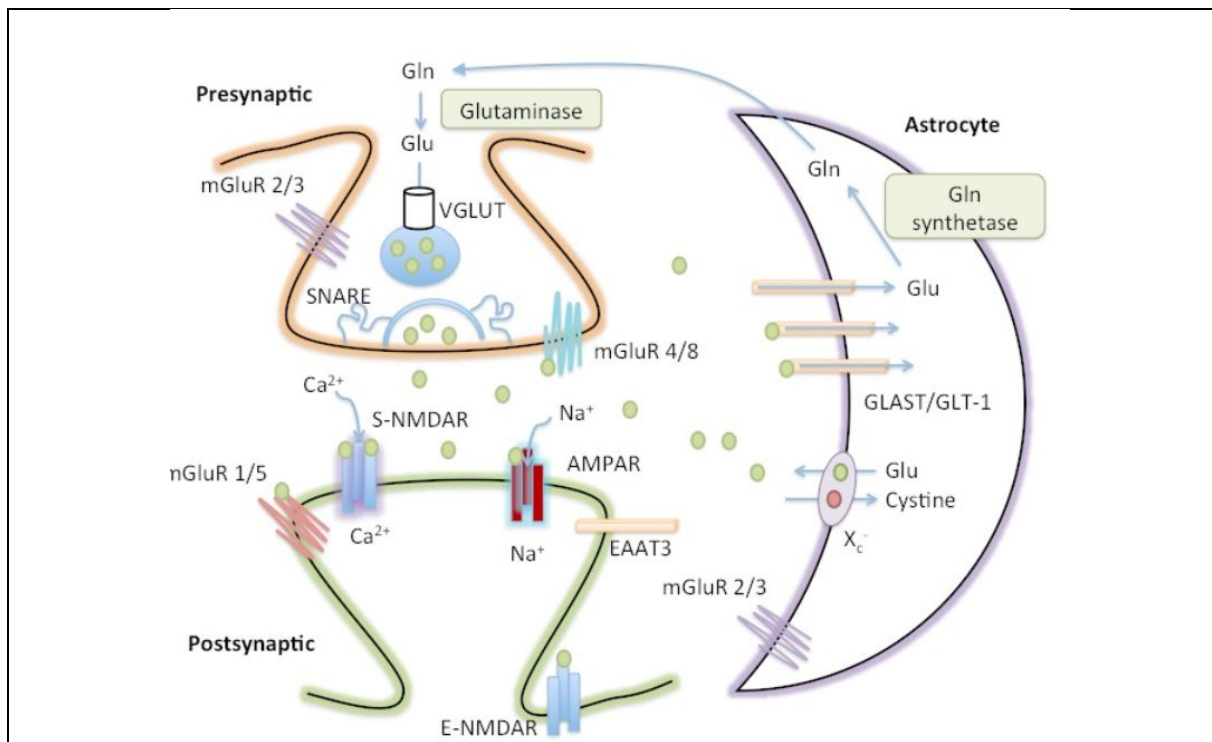


Figure 4 : La synapse tripartite glutamatergique

Dans la partie présynaptique, la glutamine (Gln) est convertie en glutamate (Glu) par la glutaminase et stockée dans des vésicules présynaptiques par le transporteur du glutamate (VGLUT). Le complexe protéique SNARE assure la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique. Les astrocytes libèrent également du glutamate via le transporteur cystine-glutamate (X_c). Suite à la libération dans l'espace extracellulaire, le glutamate se lie à la membrane présynaptique sur (mGluR2/3 et mGluR4/8), et la membrane synaptique sur (S-NMDA-R et AMPA-R) et péri et extra-synaptique (mGluR1/5 et E-NMDAR) récepteurs de glutamate. Le glutamate est éliminé de l'espace synaptique par les transporteurs d'acides aminés (les EAATs) sur les astrocytes voisins (GLAST et GLT-1) et sur les neurones par (EAAT3). Le glutamate est converti en glutamine par la glutamine synthétase au sein de l'astrocyte avant d'être transporté vers les neurones présynaptiques, achevant ainsi le cycle de glutamate-glutamine. D'après (Rudy et al., 2015).

3) Maturation post traductionnelle et glutamate

Les protéines, une fois traduites, subissent différents processus de maturation tels que la glycylation ou la glycosylation. Parmi ces mécanismes, un processus important pour la maturation de la tubuline qui implique le glutamate est appelé « polyglutamylatation ». La polyglutamylatation est une modification post-traductionnelle réversible de résidus glutamate sur la tubuline. Le glutamate peut former une liaison peptidique avec un autre glutamate libre et constitue ainsi une chaîne de polyglutamate (Edde et al., 1990) (figure 5).

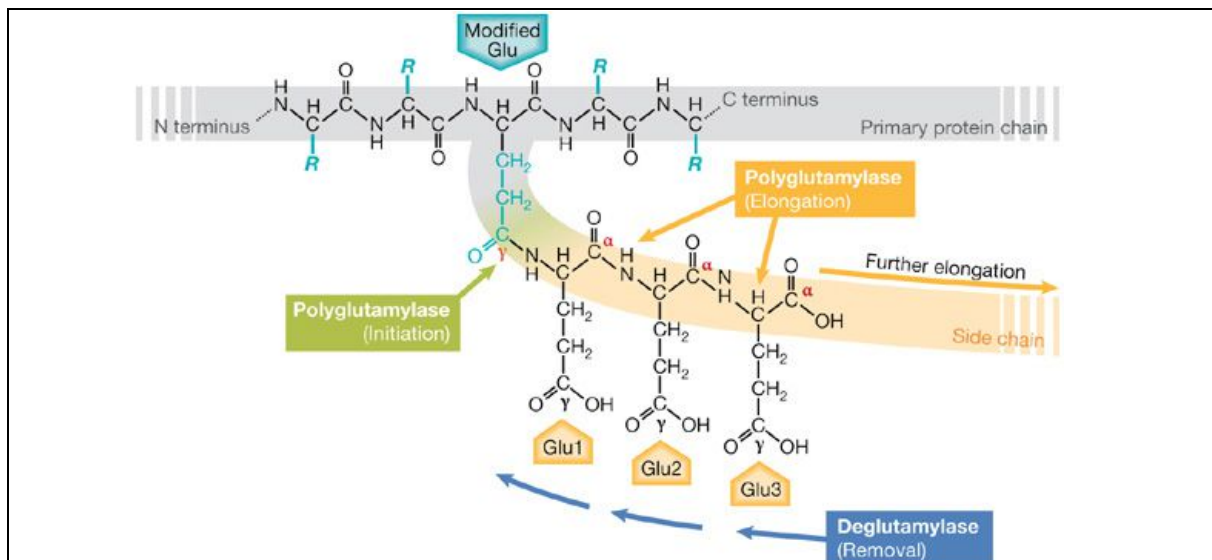


Figure 5 : La polyglutamylation de tubuline

Elle consiste à ajouter des résidus du glutamate sur la partie c-terminale de la tubuline par des enzymes appelées des polyglutamylases (Tubuline Tyrosine Ligase Like : TTLL). Ce phénomène est réversible par des déglutamylases (cytosolic carboxypeptidases : CCP) qui enlèvent les résidus de glutamate. D'après (Janke et al., 2008).

La glutamylation est présente sur différents types de microtubules. Dans les neurones, la plupart des microtubules sont généralement polyglutamylés, avec des chaînes latérales de 1 à 6 résidus de glutamate (Audebert et al., 1994). Dans la plupart des cellules de mammifères en prolifération, les microtubules présents pendant l'interphase sont glutamylés à un niveau très faible, et seulement durant la mitose. Les microtubules du fuseau mitotique montrent une augmentation du niveau de polyglutamylation spécifique de la β -tubuline (Regnard et al., 1999; Verhey and Gaertig, 2007).

La polyglutamylation se produit dans les domaines C-terminal de la tubuline (Edde et al., 1990; Redeker et al., 1994), les principaux sites de liaison de nombreuses protéines associées aux microtubules (MAPs). Il est donc hautement probable que le phénomène polyglutamylation/dépolyglutamylation régule les interactions entre microtubules et leurs partenaires (Ikegami et al., 2007; Nogales, 2000). Par ailleurs, Il a été démontré que la polyglutamylation est impliquée dans plusieurs processus liés aux microtubules, tels que la motilité des cils et des flagelles (Gagnon et al., 1996), la stabilité des centrosomes (Abal et al., 2005; Bobinnec et al., 1998) et la croissance des neurites (Ikegami et al., 2006). Les rôles des modifications post-traductionnelles de la tubuline sont représentés dans la figure 6.

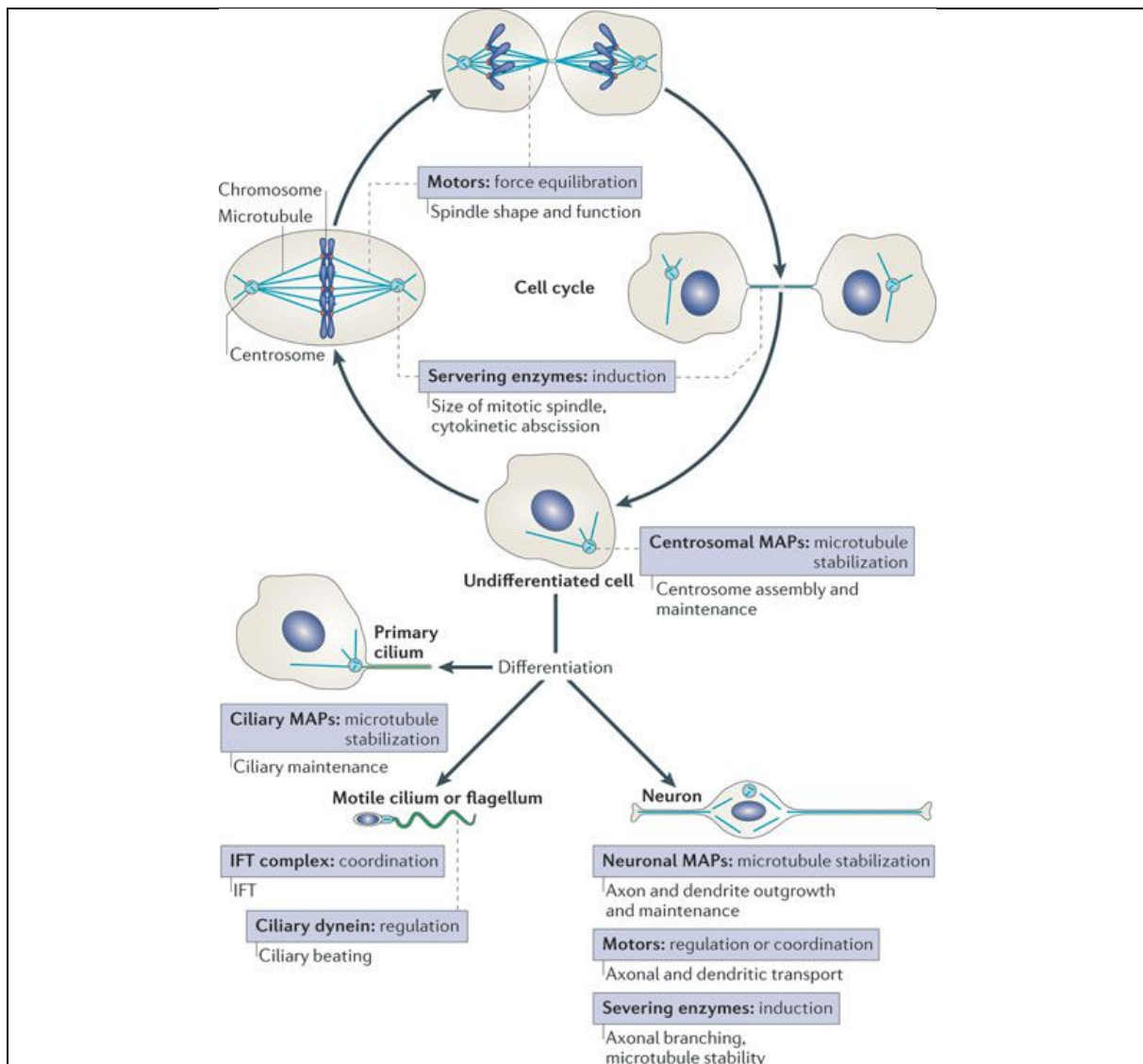


Figure 6 : Représentation schématique des rôles de la polyglutamylation dans différents types de microtubules

Au cours du cycle cellulaire, une augmentation spécifique de polyglutamylation sur le fuseau mitotique peut coordonner les forces exercées sur ces structures, ainsi que l'activité enzymatique responsable de la séparation des microtubules (Lacroix, 2010). Les très hauts niveaux de polyglutamylation des centrosomes ont été associés à la stabilité du centrosome (Bobinnec, 1998b). La combinaison des différentes modifications des microtubules contribuent au contrôle de la stabilité (Rogowski, 2009) et au mouvement des cils et des flagelles (Kubo et al., 2010; Suryavanshi, 2010). Dans les neurones, les modifications des microtubules sont impliquées dans l'orientation des processus de transport (Konishi and Setou, 2009) et pourraient contribuer à la régulation de la stabilité des microtubules (Lacroix, 2010; Sudo and Baas, 2010). Figure d'après (Janke and Bulinski, 2011).

La polyglutamylation est un système dynamique entre polyglutamylation et déglutamylation. Ainsi, tout phénomène capable d'affecter ce bon équilibre peut altérer le bon fonctionnement de la cellule que ce soit au niveau de sa division et de son cycle cellulaire, de sa différenciation, de son mouvement et sa migration, et du transport intracellulaire.

4) Synthèse et métabolisme du glutamate

La glutamine synthétase est une enzyme ubiquitaire présente dans de nombreux organes et tissus (cerveau, foie, rein, rate, tissus adipeux, testicules et muscles striés) (Arola et al., 1981). Le glutamate et la glutamine sont très importants pour l'entretien et le bon fonctionnement cellulaire. Les fonctions de la glutamine sont multiples. Elle intervient comme substrat pour la synthèse des protéines, précurseur anabolisant pour la croissance musculaire, l'équilibre acido-basique dans les reins, substrat pour l'uréogénèse dans le foie, dans les cellules du système immunitaire, le transport inter-organes d'azote, précurseur pour la synthèse des neurotransmetteurs, précurseur de la synthèse d'acides nucléiques et précurseur pour la production de glutathion (Newsholme et al., 2003). Un grand nombre de ces fonctions est lié à la formation de glutamate à partir de la glutamine (figure 7). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le glutamate peut être oxydé pour produire de l'énergie par les astrocytes dans le cerveau (McKenna, 2013).

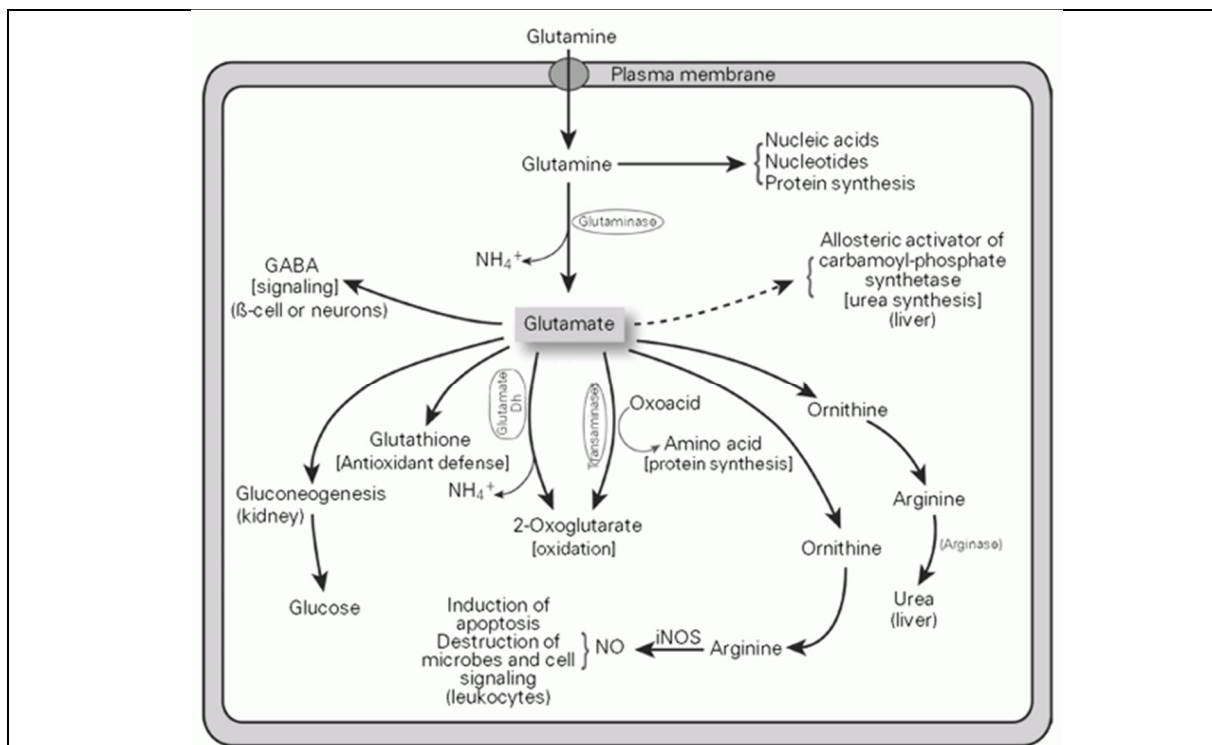


Figure 7 : Schéma montrant une vue d'ensemble du métabolisme de la glutamine et du glutamate dans les cellules de mammifères

Le glutamate est produit à partir de la glutamine par l'activité de la glutaminase. Le glutamate peut ensuite être converti en g-amino butyrique (GABA), ornithine, 2-oxoglutarate, glucose ou glutathion. Les fonctions des produits du glutamate sont indiquées, ainsi que les cellules ou les organes où la voie métabolique se produit de manière préférentielle. NO : oxyde nitrique ; iNOS : inducible nitric oxide synthase ; glutamate Dh : glutamate déshydrogénase. D'après (Newsholme et al., 2003).

Problématique

Problématique

De nouvelles études suggèrent que les femmes enceintes vivant à proximité des lieux d'épandage des pesticides, semblent présenter un risque accru d'avoir un enfant avec des traits autistiques (Roberts et al., 2007; Shelton et al., 2014). Le risque pour qu'un enfant développe de l'autisme semble être plus élevé pour les femmes habitant près de fermes, de terrains de golf et autres espaces publics traités avec des pesticides au cours des trois derniers mois de leur grossesse (Shelton et al., 2014).

Un enfant sur 68 est diagnostiqué autiste, selon les experts du CDC (US Centers for Disease Control and Prevention). L'autisme est une perturbation du développement du cerveau se manifestant généralement dans les trois premières années de la vie d'un enfant.

Les causes environnementales de l'autisme sont incertaines. Mais, certaines études ont mis en évidence la forte implication des pesticides. Les enfants de parents ouvriers agricoles, exposés à des faibles doses de pesticides de manière chronique avant leur naissance et dans les premières années de la vie, quand leur cerveau est encore en développement, ont un risque plus élevé de développer des problèmes neuro-développementaux tels que l'autisme contrairement aux enfants non exposés à ces produits chimiques (Shelton et al., 2014; Shelton and Hertz-Picciotto, 2015).

Au cours de ma thèse, en raison de l'implication du glutamate et de l'analogie structurale avec le GLA, nous avons recherché les effets de cette exposition périnatale au GLA sur la neurogenèse bulbaire et la migration des neuroblastes de la SVZ (Herzine *et al.*, Article en cours de soumission). Cette approche a été accompagnée d'observations classiques de morphométrie cérébrale et de critères cellulaires *in vivo* et *in vitro*. Nous avons ensuite cherché de potentielles cibles du GLA notamment sur l'architecture du cytosquelette et la maturation de la tubuline (Herzine *et al.*, Article en cours de rédaction). Par ailleurs, nous avons étudié les conséquences comportementales des effets du GLA évaluées via l'analyse de la maturation fonctionnelle du cerveau par des tests sensorimoteurs et une analyse comportementale des animaux devenus adultes (Laugeray, Herzine *et al.*, 2014).

La stratégie de recherche utilisée consiste à exposer des souris au GLA pendant la période périnatale à de faibles concentrations (deux groupes GLA0.2 et GLA1 à 0,2 et 1 mg/kg respectivement trois fois par semaine). Lors de ce travail, nous avons, dans un premier temps, analysés les perturbations transcriptomiques des animaux exposés. L'analyse transcriptomique au niveau cérébral chez les souriceaux mâles de 15 jours a permis de mettre en évidence des altérations de l'expression d'un nombre important de gènes pour les deux doses d'exposition. Les gènes perturbés au niveau de leur expression par l'exposition aux pesticides sont des éléments importants à la compréhension des processus neurotoxiques.

L'analyse de ces données transcriptomiques nous a conduits à approfondir l'étude au niveau histologique et cellulaire. En effet, si chez les GLA1 les aspects synaptiques semblaient fortement perturbés, les données des GLA0.2 nous ont suggérés qu'en premier lieu, un aspect prolifératif et/ou de migration cellulaire pouvait être affecté.

Dans un deuxième temps, j'ai étudié les altérations au niveau histologique, plus particulièrement, au niveau de la production de nouveaux neurones dans la SVZ et leur migration vers les BO. Cette partie est constituée, tout d'abord, d'une analyse histologique et d'un marquage immunohistologique des zones cérébrales concernées, puis d'une analyse de la prolifération et d'un suivi de la migration *in vivo* avec un marquage au BrdU. Et enfin, ces perturbations ont été confirmées en culture d'explants *ex vivo* de SVZ d'animaux exposés en période périnatale, et cela nous a permis d'analyser les aspects morphologiques et la formation de chaînes des neuroblastes.

Je me suis intéressé ensuite à la recherche de cibles potentielles du GLA. En effet, les données et les observations obtenues, nous ont amenés à nous interroger sur l'existence d'une cible moléculaire pour expliquer, du moins en partie, ces effets. Des expériences *in vitro* supplémentaires (culture de neurones, cultures de cellules souches) semblent conduire à l'hypothèse d'une altération de la maturation de la tubuline par le GLA, et notamment de la polyglutamylation, en raison de l'analogie structurale du GLA avec le glutamate.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux conséquences comportementales du GLA. Une batterie de tests neurocomportementaux a été réalisée afin de mettre en évidence des effets sur la mise en place de certains réflexes sensori-moteurs

précoces, sur la communication des nouveau-nés (vocalisations) ainsi que sur les comportements lorsque les animaux sont devenus adultes notamment au niveau olfactif afin de rechercher des troubles comportementaux liés à une perturbation neuro-développementale.

*Le Glufosinate d'ammonium et la
migration neuronale*

Le glufosinate d'ammonium et la migration neuronale

1) Introduction

Le GLA est un analogue structural du glutamate. Comme décrit précédemment, il agit comme un inhibiteur compétitif et irréversible de la glutamine synthétase, une enzyme essentielle chez les plantes. Cependant, la glutamine synthétase est également présente dans le système nerveux central des mammifères (SNC). Dans les cellules astrogliales, la glutamine synthétase joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du glutamate, un neurotransmetteur majeur dans le SNC (Bak et al., 2006). Les effets neurotoxiques du GLA se manifestent par des convulsions et des pertes de la mémoire comme en témoignent quelques cas de patients ayant ingurgité de grandes quantités du produit lors de tentatives de suicide (Park et al., 2006). Dans les modèles animaux, le GLA induit des convulsions chez la souris (Lapouble et al., 2002). Le GLA provoque des altérations de la neurotransmission du glutamate et des perturbations de son homéostasie (Calas et al., 2008; Meme et al., 2009; Nakaki et al., 2000). Bien que les effets neurotoxiques de doses aiguës de GLA sont bien documentés, on en sait peu sur ses effets chroniques et à de faibles doses pendant les phases de développement neurologique. Il est essentiel de caractériser les effets nocifs à long terme, qui peuvent interférer avec le développement du cerveau et conduire à des anomalies permanentes.

Au cours du développement du système nerveux, les neuroblastes ont un fort potentiel de migration vers leur destination finale. Dans le cerveau adulte, de nouveaux neurones sont générés en continu dans la niche neurogène située près du ventricule, et les cellules nouvellement générées migrent activement vers les bulbes olfactifs. Les neuroblastes en migration forment des chaînes grâce à leurs interactions homophiles. La migration des précurseurs neuronaux vers les bulbes olfactifs est orchestrée par de multiples signaux sécrétoires (Coskun and Luskin, 2002; Whitman and Greer, 2009).

La production de neurones adultes est un processus continu. Chez les rongeurs, les estimations suggèrent que 10 000 à 30 000 neurones sont produits chaque jour (Lledo et al., 2006). Ce taux de rotation élevé exige des mécanismes homéostatiques profonds capables de réguler et de coordonner les différentes étapes de la neurogenèse et d'éviter une surproduction de neurones. L'homéostasie est

assurée grâce à l'interaction génétique (intrinsèque) et les signaux du microenvironnement (extrinsèques). Certaines études ont démontré que les neurotransmetteurs sont les principaux régulateurs de la neurogenèse (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Platel et al., 2008; Platel et al., 2007; Platel et al., 2010b).

La zone sous ventriculaire qui est une zone de neurogenèse est composée de différents types cellulaires, y compris les cellules astrocytaires. Les voies de signalisation GABA et glutamate ont été décrites entre les neuroblastes et les cellules astrocytaires. C'est une communication bidirectionnelle entre ces deux types de cellules qui consiste à réguler la prolifération et la migration des neuroblastes (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Platel et al., 2008; Platel et al., 2010a).

Cette homéostasie peut être perturbée par de nombreux xénobiotiques. Par conséquence, la SVZ pourrait être extrêmement sensible aux composés neurotoxiques comme le GLA. L'étude d'une telle exposition est d'autant plus importante pendant les premiers jours du développement en raison de l'immaturité de la BHE, à peine fonctionnelle (Stewart and Hayakawa, 1987; Watson et al., 2006)

Dans cette étude, nous avons supposé que le GLA, étant un analogue structural de glutamate, peut affecter les niches de cellules souches sous ventriculaires en raison d'un ensemble de mécanismes impliquant le glutamate. Pour ce faire, nous avons étudié les possibles effets d'une exposition périnatale au GLA sur la prolifération et la migration neuroblastique, deux points très importants dans le développement cérébral sur un modèle mammifère.

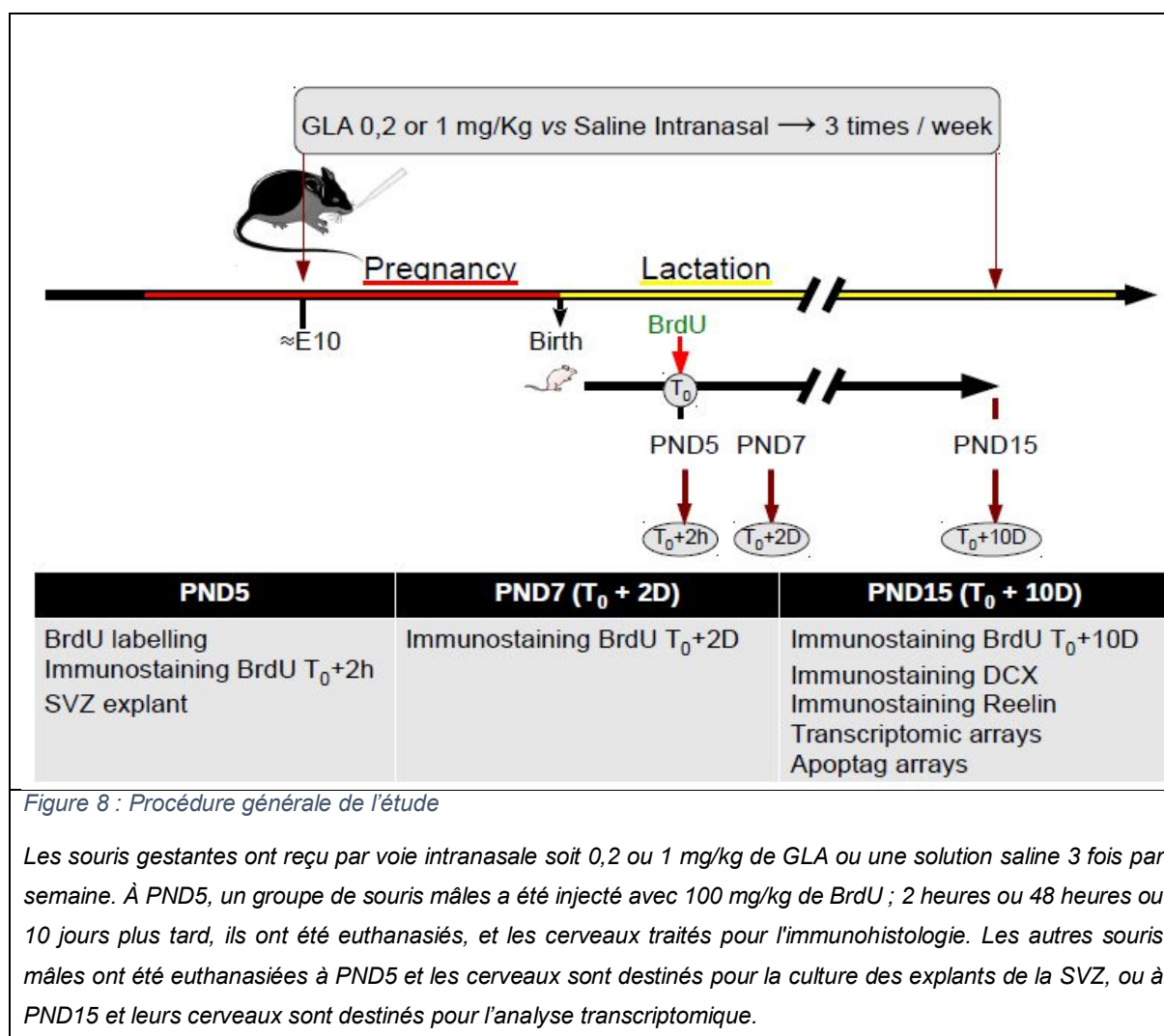
2) Matériel et méthodes

a) Matériel biologique

L'étude est réalisée avec des souris de fond génétique C57BL/6J provenant de chez Janvier® (Le Genest St Isle, France). Ces souris sont hébergées en groupe dans une animalerie conventionnelle et maintenues dans des conditions contrôlées d'humidité et de température avec une alternance jour/nuit de périodicité 12h/12h et un accès illimité à l'eau et la nourriture. Toutes les expériences ont été menées de façon à limiter le nombre d'animaux utilisés et leur souffrance en accord avec les règles émises par le comité d'éthique pour l'expérimentation. Tous les aspects des expérimentations étaient conformes à la directive du Conseil des Communautés européennes (2010/63/UE). Le comité d'éthique a approuvé tous les protocoles expérimentaux utilisés pour cette étude (numéro d'approbation C45-234-6).

Deux souris femelles sont mises en contact avec un mâle pendant 5-6 jours. Les souris gestantes sont ensuite isolées et divisées en deux groupes expérimentaux et traitées par voie intranasale avec une solution de GLA (1 mg/kg ou 0,2 mg/kg ; PESTANAL®, Sigma-Aldrich) ou une solution saline. Les souris ont été traitées trois fois par semaine durant la période périnatale, c'est à dire au cours de la période de gestation et de l'allaitement (figure 8) à partir du 10ème jour embryonnaire (E10) jusqu'au 15ème jour postnatal (PND15). Le volume d'instillation était de 10 µl pour 30 g de souris. Les animaux témoins ont reçu un volume comparable de solution saline 0,9 %. Les portées ont été maintenues dans la même cage avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau. Les expériences sont réalisées sur des souriceaux indirectement exposés à la molécule.

La procédure générale est représentée sur la figure 8. Un groupe de souriceaux à PND5 est injecté au BrdU (100 mg/kg) et sacrifié soit 2 heures, 48 heures ou bien 10 jours après pour le suivi de la migration *in vivo*. Un autre groupe de souriceaux est sacrifié à PND5 pour réaliser des cultures d'explants de la SVZ sur matrigel®. Les Western Blot, le test Apoptag®, les immunomarquages et la transcriptomique ont été réalisés sur des cerveaux de souriceaux à PND15.



b) Culture d'explants de la zone sous ventriculaire (SVZ) et du cervelet sur Matrigel®

Après décapitation, les encéphales sont prélevés et placés dans du milieu de dissection (Leibovitz's L-15, GIBCO) et les méninges sont retirés. Des morceaux ou explants de la SVZ situés en bordure des ventricules latéraux, sont disséqués sur les coupes frontales de 500 μ m obtenues à l'aide d'un vibratome (Leica VT1200S). Les fragments de SVZ sont dissociés mécaniquement à l'aide d'un microscalpel. Les explants sont déposés sur des lamelles préalablement enduites de Matrigel® au fond d'un puits de boîte de culture. La solidification du Matrigel® (BD Biosciences) est effectuée par une incubation à 37 °C pendant 30 minutes (le Matrigel® reste liquide à 4 °C et se gélifie à 37 °C). Les explants sont ensuite incubés avec du milieu Neurobasal (GIBCO) complété de 10 % de SVF, supplément B-27 (GIBCO), 0.5 mM de L-glutamine (GIBCO) et des antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine,

GIBCO) dans un incubateur à 37 °C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ (RS Biotech). Après 3 jours de culture, les explants sont observés et photographiés en lumière transmise avec un microscope inversé (Nikon TE300) puis fixés par du TBS-paraformaldéhyde 4 % et conservés à 4 °C dans du TBS en vue de réaliser ensuite des marquages immunocytologiques.

c) Réalisation de coupes histologiques

Les cerveaux sont prélevés sur souriceaux de PND5, PND7 ou PND15 et fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) pendant 24 à 48 heures à 4 °C, puis ils sont cryoprotégés dans une solution de tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) contenant 30 % de sucrose pendant 48 heures minimum à 4 °C. Les cerveaux sont ensuite congelés dans un bloc de tissue-tek® (milieu de cryoenrobage) à -50 °C dans de l'isopentane (ou 2-méthylbutane, Sigma) pendant 1 à 2 minutes. Des coupes coronales de 14 µm d'épaisseur sont réalisées à -20 °C au cryostat (Leica CM3050 S).

d) Immunohistologie

Des coupes coronales au niveau de la SVZ ou au niveau des BO des souris à PND15 sont utilisées pour ces expériences.

Un rinçage au TBS trois fois 5 minutes est réalisé, suivi par une incubation avec une solution de saturation qui contient 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de Bovine serum albumin (BSA) et 0,3 % de triton X-100 pendant 45 minutes. Les lames sont ensuite incubées une nuit avec l'anticorps anti-DCX (abcam, polyclonal IgG de lapin) ou bien avec l'anticorps anti-Reelin (abcam, monoclonal de souris) dilués au 1/500^{ème} dans la solution de saturation. Après rinçage au TBS, les lames sont ensuite incubées 2 heures, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488 (Invitrogen) dilué au 1/1000^{ème} ou un anticorps anti-IgG de souris couplé au fluorochrome TRITC (Rouge) dans la solution de saturation sans Triton. Les lames sont rincées dans le TBS. Un marquage nucléaire est ensuite effectué avec une solution de DAPI (4',6'-diamidino-2- phénylindole) (Sigma) pendant

10 minutes suivi d'un lavage au TBS. Pour le montage des coupes, un milieu de montage, le Fluoromount-G (Southern Biotech), est employé.

e) Immunomarquage anti BrdU

Le BrdU (Bromodeoxyuridine, 5-bromo-2'-deoxyuridine) est un nucléotide synthétique analogue de la thymidine. Il est utilisé pour la détection des cellules qui prolifèrent dans les tissus vivants. Le BrdU peut être incorporé dans l'ADN nouvellement synthétisé des cellules en cours de réplication (durant la phase S de la mitose), à la place de la thymidine. Des anticorps spécifiques peuvent ensuite être utilisés afin de détecter le BrdU incorporé, révélant ainsi les cellules qui répliquaient leur ADN activement. La liaison de l'anticorps nécessite la dénaturation de l'ADN, généralement en exposant les cellules à de l'acide ou à la chaleur.

Nos immunohistologies anti BrdU ont été réalisées sur des cerveaux de souriceaux injectés préalablement au BrdU à PND5 et sacrifiés soit 2 heures, 48 heures ou 10 jours après. Cette stratégie a pour objectif de suivre les cellules marquées au BrdU au cours du temps.

Notre protocole débute par une incubation des lames 30 minutes dans le citrate à 90 °C. Après un bref passage dans de l'eau distillée les coupes sont incubées 10 minutes dans une solution HCL 1N pendant 10 minutes à 4 °C suivi d'une incubation de 45 minutes dans une autre solution HCL 2N à 37 °C. Les lames sont ensuite rincées quelques secondes à l'eau distillée et une minute dans une solution borate à 0,1 M. Ceci permettra de dénaturer l'ADN qui consiste à ouvrir la double hélice pour permettre aux anticorps d'accéder au BrdU. Un rinçage au TBS est effectué avant de lancer la saturation (1 % BSA, 10 % SVF, 0,3 % Triton x-100) pendant 45 minutes. L'incubation avec l'anticorps anti-BrdU (abcam, monoclonal IgG2a de rat) dilué au 1/200^{ème} dure toute une nuit. Après rinçage au TBS, les coupes sont ensuite incubées 2 heures avec un anticorps secondaire, fait chez l'âne, anti-IgG2a de rat, couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (Invitrogene) dilué au 1/1000^{ème} dans la solution de saturation sans Triton, à l'abri de la lumière. Les coupes sont rincées avec du TBS pendant 10 minutes. Un marquage nucléaire est ensuite effectué avec une solution de DAPI (Sigma) suivi d'un lavage au TBS. Pour le montage des coupes, le milieu Fluoromount-G (SouthernBiotech), est employé.

f) Immunocytologie

Une fois fixées, les cultures d'explants sont rincées trois fois au TBS, ensuite les lamelles sont incubées avec une solution de saturation qui contient 10 % de SVF, 1 % de BSA et 0,2 % de triton X-100 pendant 20 minutes. Les lamelles sont ensuite incubées 1 heure avec l'anticorps anti-DCX dilué au 1/500^{ème} dans la solution de saturation. Après rinçage au TBS, les lamelles sont ensuite incubées 30 minutes, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (Invitrogen) dilué au 1/1000^{ème}. Les lamelles sont rincées dans le TBS. Un marquage nucléaire est ensuite effectué avec une solution de DAPI (Sigma) suivi d'un lavage au TBS. Pour le montage des coupes, un milieu de montage, le Fluoromount-G (SouthernBiotech), est employé.

g) Marquage des cellules apoptotiques (marquage tunnel)

Le principe de la technique de TUNEL est de révéler la présence de cassures dans l'ADN (présentes dans les cellules en apoptose) par une réaction de polymérisation mettant de nucléotides modifiés qui sont par la suite mis en évidence via une réaction d'immunohistologie. Le marquage des cellules apoptotiques est réalisé avec le kit *ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit* (EMD Millipore) en suivant le protocole indiqué. En bref, les coupes ont été traitées comme indiqué, fixées dans du paraformaldéhyde à 1 %, lavées trois fois dans du TBS, incubées dans un tampon d'équilibration pendant 10 minutes puis incubées avec la désoxynucléotidyl transferase terminale pendant 60 minutes à 37 °C. Au bout de 10 minutes, les coupes sont placées dans le tampon «stop» pour arrêter l'activité de l'enzyme, les coupes ont été incubées avec l'anti-digoxigénine pendant une nuit à 4°C. Après lavage dans du TBS, un marquage nucléaire est ensuite effectué avec une solution de DAPI (Sigma) suivi d'un lavage au TBS. Pour le montage des coupes, un milieu de montage, le Fluoromount-G (SouthernBiotech), est employé.

h) Extraction d'ARN totaux

Les ARNs totaux sont extraits des cerveaux de souriceaux PND15 suivant le protocole de la méthode TRIZOL®. Brièvement, après sacrifice des animaux par

décapitation, les cerveaux sont disséqués puis congelés directement dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Pour l'extraction des ARNs totaux, chaque cerveau est broyé à l'aide d'un ultra-turax dans 1 mL de solution de TRIZOL®. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante permettant la cassure des liaisons nucléopeptidiques, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (12000 g / 10 minutes à 4 °C). Pour permettre la séparation des protéines, de l'ADN et des ARNs totaux des échantillons 100 µL de BCP (Bromo Chloro Phénol) sont ajoutés à température ambiante. Après une homogénéisation énergique, incubation à température ambiante (10 minutes) et centrifugation (12000g / 10 minutes à 4 °C) nous obtenons 3 phases : la phase aqueuse supérieure contenant les ARNs totaux, une phase rouge phénolique inférieure contenant les protéines et un anneau central blanc contenant l'ADN. Après prélèvement minutieux de la phase aqueuse, les ARNs totaux sont précipités par ajout de 500 µL d'isopropanol. Après homogénéisation et centrifugation (12000g / 10 minutes à 4 °C), les ARNs totaux culotés sont lavés avec 1ml d'éthanol 70 %, puis séchés à l'air libre pendant 3 à 5 minutes et enfin re-dissouts dans de l'eau pure sans nucléase. Les échantillons sont stockés à -80 °C.

i) Puce d'expression ou puce transcriptomique.

Les puces d'expression (*Affymetrix Mice Exon 1.0 ST array 1.0, Affymetrix, Santa Clara, CA*) sont réalisées sur les ARNs totaux extraits des cerveaux de souriceaux à PND15. Le protocole général est décrit en figure 9. Brièvement, à partir des ARNs totaux (200 ng), les ARNm sont spécifiquement rétro-transcrits en ADNc (ADN complémentaire) simple brin puis double brin. L'obtention de ces ADNc, spécifiques des ARNm, sont la matrice pour une expansion transcriptomique générale de tous les ARNm par transcription *in vitro* (IVT). Après 18 heures d'IVT, nous avons généré une grande quantité d'ARNc (en moyenne 1500ng/µl). Après purification sur billes magnétiques, les ARNc sont rétro-transcrits en présence de dUTP modifiés (désoxy-uracil tri-phosphate) et de dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate) pour obtenir des ADNc « marqués ». Les matrices d'ARNc sont dégradées par de la RNase H. Après une nouvelle purification sur billes magnétiques, nous obtenons une quantité suffisante d'ADNc marqués pour l'hybridation finale (5500 ng d'ADNc). Cependant, avant cette dernière étape, les ADNc sont fragmentés par deux enzymes spécifiques

(UDG (Uracil DNA Glycosylase) et APE1 (Endonucléase Apurinic-Apyrimidinic humain)) puis marqués en 3' par de la biotine grâce à l'enzyme TDT (Terminal Deoxynucleotidyl Transférase). Une fois marqués, les 5500 ng d'ADNc sont injectés dans la puce EXON1.0. Après hybridation pendant 16 à 18 heures et lavage des puces, ces dernières sont scannées par un laser argon 488 nm permettant d'obtenir les mesures de fluorescence pour chaque fragment d'ADNc.

A l'aide du logiciel Genespring X, l'intensité de fluorescence de chaque exon de chaque ARNm de départ est calculée. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la concentration (en UA) de ce fragment d'ADNc et donc à la quantité initiale (en UA) « d'expression génique ». Ce logiciel permet d'obtenir les listes de gènes significativement et dérégulés entre nos échantillons Contrôles, GLA0.2 et GLA1. L'analyse statistique réalisée, et validée par la littérature, est une analyse ANOVA globale, suivie d'un test post-Hoc, et d'une correction mathématique de Benjaminin Hochberg. Dans un souci d'éviter le plus possible les faux-positifs, une fois la liste des gènes significativement dérégulés, nous nous focalisons uniquement sur ceux dont les variations sont de plus de 20% (analyse de Fold-Change 1.2).

Dans notre étude, nous n'avons pas étudié l'ensemble des gènes de la cellule mais nous nous sommes focalisé sur les gènes en relation avec le cytosquelette. La liste de ces gènes a été obtenue sur la base de données GSEA – Gene Set Enrichissement Analysis (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>).

j) Observations microscopique

Les images ont été acquises sur un microscope à fluorescence (Leica DM6000b) avec une caméra DFC310FX (Leica) et le logiciel Metamorph®. Pour chaque section au moins une photographie de chaque structure a été réalisée. Les images sont ensuite analysées par le logiciel ImageJ® (NIH).

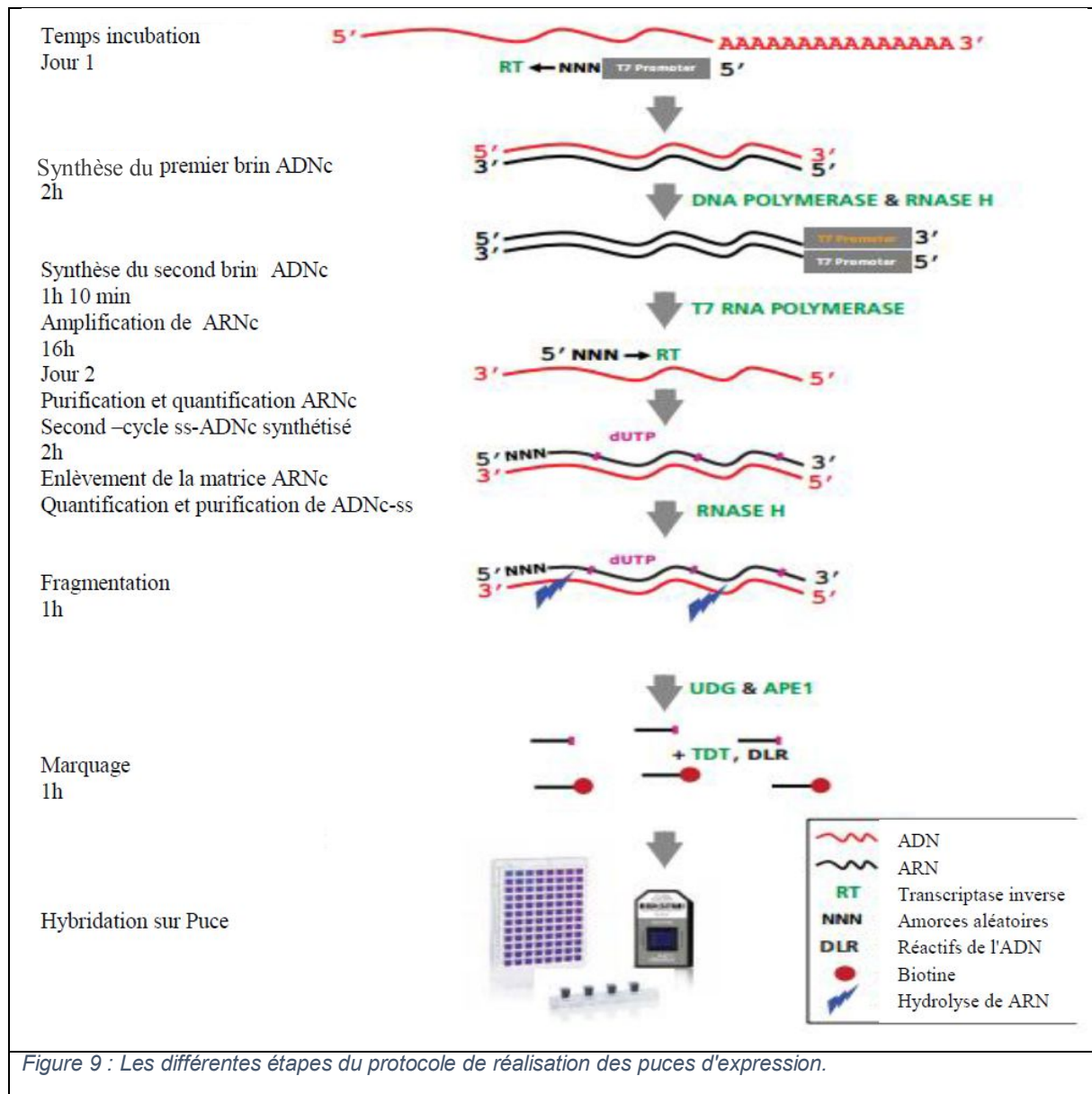


Figure 9 : Les différentes étapes du protocole de réalisation des puces d'expression.

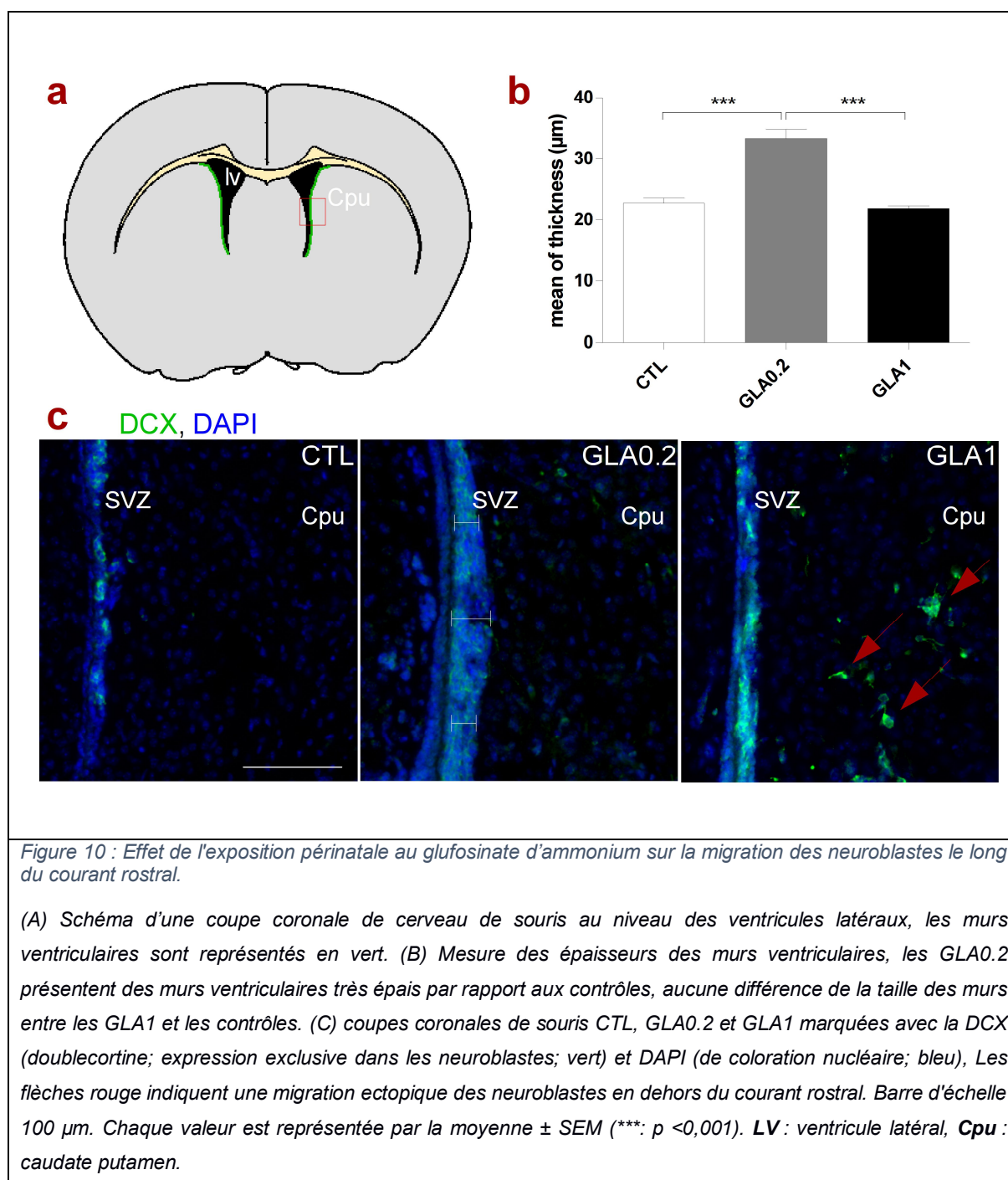
k) Analyses statistiques

Pour l'analyse statistique, les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ l'erreur standard moyenne (SEM). Les données impliquant plus de deux groupes ont été analysées par analyse de variance ($P < 0.05$, ANOVA), les données ont été rassemblées pour chaque groupe. Le test t de Student a été utilisé pour les comparaisons impliquant deux groupes. La significativité a été fixée à $p < 0,05$. La correction post hoc de Bonferroni a été utilisée pour contrôler les tests de comparaison multiples.

3) Résultats

a) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la zone sous ventriculaire

Pour étudier les effets du GLA sur les niches sous ventriculaires, des mesures morphologiques de la SVZ ont été d'abord effectuées sur des souris âgées de 15 jours et exposées en périnatal. En ce qui concerne les épaisseurs des murs ventriculaires, il n'y a pas de différence entre les souris CTL et les souris GLA1. En effet, les murs ventriculaires des CTL mesurent $22.77 \pm 1.79 \mu\text{m}$ (n=5) et ceux des GLA1 $21.94 \pm 1.10 \mu\text{m}$ (n=6), les épaisseurs des couches restent inchangées (figure 10). En revanche, les souris GLA0.2 présentent une épaisseur des murs sous ventriculaires significativement plus importante ($p=0.0003$) par rapport aux épaisseurs moyennes des souris CTL ($33.46 \pm 3.46 \mu\text{m}$ (n=5)). Deux hypothèses peuvent émerger à ce stade en ce qui concerne les GLA0.2 : 1) Une prolifération cellulaire accrue chez les GLA0.2 ou, 2) un défaut de migration des neuroblastes et leur difficulté à quitter la SVZ. Une migration ectopique des neuroblastes est aussi observée dans les cerveaux des souris GLA1, en effet, quelques neuroblastes migrent vers le striatum au lieu de suivre le courant rostral.



b) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la prolifération dans la zone sous ventriculaire et la migration des neuroblastes vers les bulbes olfactifs

Au cours de la première semaine après la naissance, un grand nombre de cellules de la couche sous-épendymaire est généré au niveau des ventricules latéraux et migre ensuite vers les bulbes olfactifs, principalement dans la couche de cellules granulaires (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Winner et al., 2002). Ces neuroblastes

donnent naissance à des interneurones qui s'intègrent dans le réseau neuronal préexistant ou alors ils rentrent en apoptose (Mouret et al., 2008).

Pour étudier la prolifération des neuroblastes et suivre leur migration au cours du temps, chez des souris exposées en périnatal au glufosinate d'ammonium, nous avons étudié la distribution du BrdU dans les cellules au niveau de la SVZ, du neuro-épithélium et des différentes couches des BO. Les mesures de densité de BrdU ont été effectuées soit 2 heures, 48 heures ou bien 10 jours après injection (c'est-à-dire à PND5, PND7 et PND15). Le BrdU, étant un marqueur mitotique, nous permet d'évaluer la prolifération et de suivre la migration des neuroblastes dans le courant rostral.

Pour étudier l'effet de l'exposition périnatale au GLA sur la prolifération cellulaire au niveau de la SVZ, la densité du marquage BrdU a été mesurée dans cette zone 2 heures après l'injection (figure 11a). Cette analyse quantitative exprimée en unité arbitraire (UA) de marquage BrdU dans la SVZ n'a pas révélé de différence de la prolifération cellulaire entre les CTL et GLA1 (0.091 ± 0.0025 pour les CTL et 0.08 ± 0.0045 pour les GLA1). En revanche, la densité du BrdU à 2h, ce qui reflète la prolifération de base, est significativement diminuée ($p=0.0034$) chez les GLA0.2 avec une valeur de densité moyenne de 0.068 ± 0.0026 . L'hypothèse émise auparavant à propos de l'épaississement de la SVZ des GLA0.2 stipulait une augmentation de prolifération au niveau de cette zone. Or, les résultats des expériences BrdU nous montrent le contraire. L'hypothèse la plus probable alors est un défaut de migration des neuroblastes et leurs difficultés à quitter la SVZ. Les mesures de densité de fluorescence au niveau du neuro-épithélium et des BO n'ont montré aucune différence entre les différents groupes expérimentaux (figure 11b). Cette intensité est de 0.059 ± 0.007 chez les CTL, 0.063 ± 0.004 chez les GLA0.2 et 0.065 ± 0.005 chez les GLA1.

Les mesures d'intensité de BrdU réalisées sur les animaux sacrifiés à PND7, c'est à dire 48 heures après injection du BrdU, nous révèlent une diminution significative ($p=0.0002$) au niveau de la SVZ des animaux CTL. En effet, l'intensité du marquage BrdU passe de 0.091 ± 0.0025 à 2 heures à 0.0554 ± 0.001 à 48 heures (figure 11c). Cette diminution d'intensité du signal BrdU au niveau de la SVZ s'est accompagnée d'une augmentation significative ($p=0.0028$) d'intensité de ce signal avec une valeur qui passe de 0.059 ± 0.007 à 0.102 ± 0.004 au niveau du neuro-épithélium et des BO ce qui reflète une migration des cellules de la SVZ vers les bulbes olfactifs des animaux CTL (figure 11d).

Cependant, chez les souris exposées au GLA, ce processus semble être retardé (figures 11c et 11d). En effet, on n'observe pas de diminution d'intensité de fluorescence chez les GLA0.2 au niveau de la SVZ (0.70 ± 0.007). Elle reste stable au bout de 48 heures. De même, on n'observe pas d'augmentation de cette intensité au niveau des BO (0.076 ± 0.006). Ce résultat confirme notre hypothèse sur l'épaississement des murs ventriculaires des GLA0.2. En effet, les neuroblastes ont du mal à quitter la SVZ et à entamer leur migration le long du courant rostral vers les BO.

Chez les GLA1, c'est un peu différent, l'intensité du signal est diminuée significativement ($p=0.0032$) au niveau de la SVZ à 48 heures (0.059 ± 0.004) ce qui signifie que les neuroblastes ont quitté la SVZ, mais on n'observe pas d'augmentation du signal au niveau des BO à 48 heures (0.077 ± 0.011). Ce résultat atteste d'un possible défaut de migration bulbaire mais une migration vers d'autres structures, ce qui peut expliquer la migration ectopique et les neuroblastes déjà observés au niveau des couches extérieures de la SVZ et du striatum.

Dans la période post-natale, environ 50 % des neuroblastes qui migrent vers les BO se différencient pour former des interneurons qui s'intègrent dans les circuits neuronaux, tandis que l'autre moitié subit une mort cellulaire programmée (Lledo and Saghatelian, 2005; Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Winner et al., 2002). Pour étudier les effets du GLA sur la survie des neuroblastes, nous avons utilisé les animaux sacrifiés 10 jours après injection du BrdU. Les résultats montrent une baisse significative d'intensité de fluorescence du BrdU au niveau de la SVZ dans tous les groupes expérimentaux comparée aux intensités observées à 2 heures, en revanche, aucune différence n'est observée entre les différents groupes. Les niveaux de densité du BrdU sont de 0.0517 ± 0.008 chez les CTL, 0.0553 ± 0.0105 chez les GLA0.2 et 0.513 ± 0.005 chez les GLA1. Par ailleurs, au niveau des BO, une baisse significative de cette intensité est observée chez les CTL (0.0415 ± 0.008). En revanche, chez les GLA0.2 et GLA1, l'intensité de fluorescence du BrdU est augmentée (0.102 ± 0.002 pour les GLA0.2 et 0.0767 ± 0.008 pour les GLA1) (figure 11e et 11f).

Chez les souris CTL, sur l'ensemble des neuroblastes qui arrivent dans les BO, seul un petit pourcentage d'entre eux s'intègre dans les circuits neuronaux. De nombreuses cellules meurent par apoptose. En revanche, chez les souris exposées au glufosinate d'ammonium, la migration des neuroblastes semble être perturbée. Chez les GLA0.2,

la majorité de ces cellules semble avoir séjourné près de la SVZ pendant au moins 7-10 jours avant d'arriver dans les BO. Chez les GLA1, la migration est aussi retardée en plus de la migration ectopique.

La survie neuronale est donc augmentée chez les souris exposées mais l'étude de l'apoptose au niveau de la SVZ et des bulbes olfactifs est nécessaire pour confirmer ces résultats.

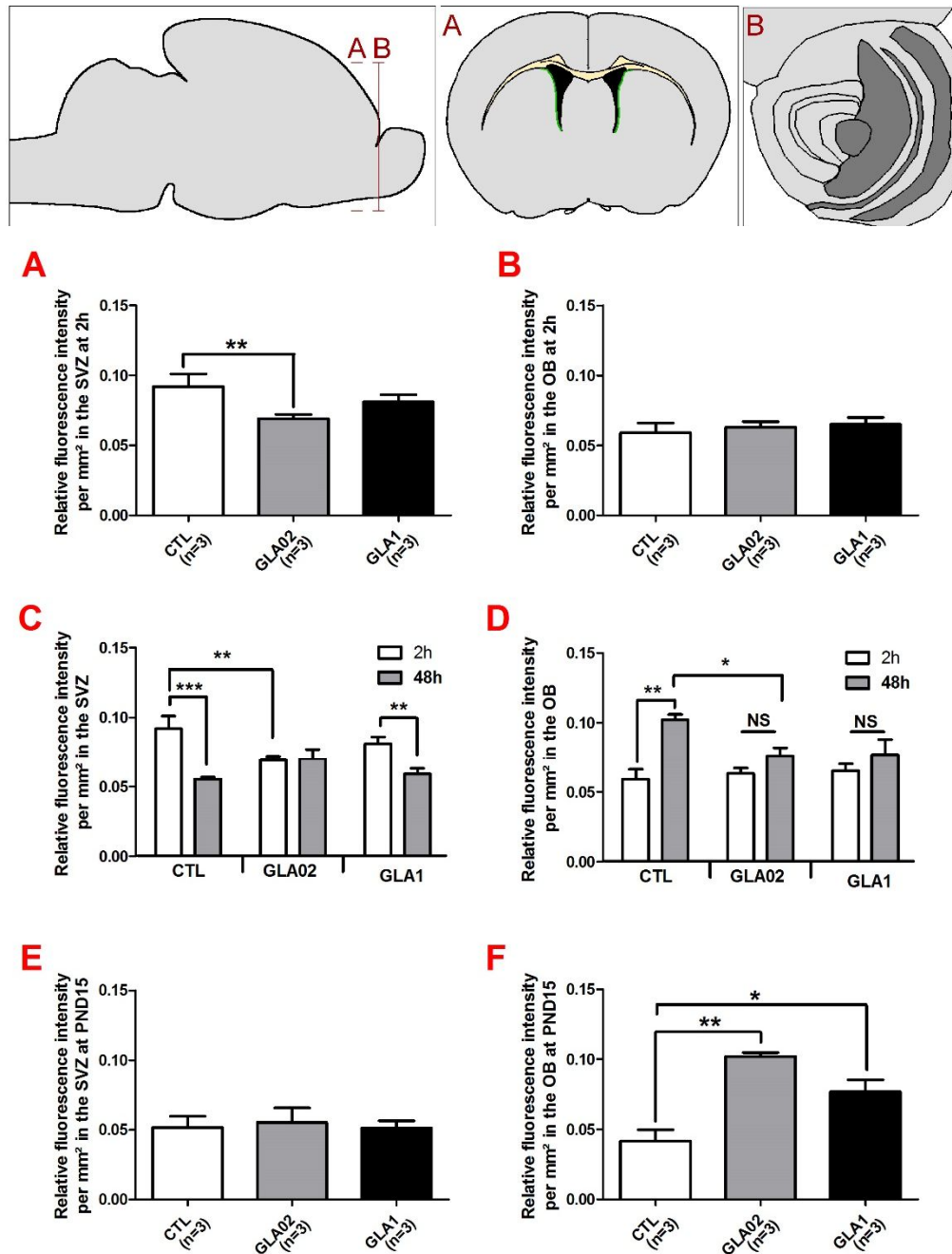


Figure 11 : Suivi de la migration des neuroblastes in vivo avec un marquage au BrdU

L'intensité du marquage BrdU a été mesurée sur des coupes coronales de souris préalablement injectées au BrdU à PND5 et sacrifiées 2h, 48h ou 10 jours après. A 2h, cette mesure de densité de BrdU est relative au taux de prolifération cellulaire, et les résultats montrent une diminution de prolifération uniquement chez les GLA0.2 au niveau de la SVZ (A). Aucune différence de prolifération n'a été détectée au niveau des BO (B). Les mesures effectuées à 48h et comparées à celles effectuées à 2h nous indiquent des mouvements cellulaires entre la SVZ et les BO. Au niveau de la SVZ, on remarque une baisse d'intensité chez les CTL et GLA1 mais pas chez les GLA0.2 (C). De la même manière, on constate une augmentation de cette intensité uniquement chez les CTL (D). A PND15, l'intensité de fluorescence est au plus bas niveau et identique chez tous les groupes au niveau de la SVZ (E). En revanche, au niveau des BO, l'intensité est plus importante chez les GLA0.2 et GLA1 (F). Chaque valeur est représentée par la moyenne $\pm$ SEM (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ *** : $p < 0,001$).

c) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la structure de la couche de cellules mitrales et la cyto-architecture des bulbes olfactifs

La Reelin est essentielle pour le développement neurologique et notamment pour la migration neuronale. En effet, la Reelin induit le détachement des neuroblastes de leur formation de chaîne au niveau du neuro-épithélium (Simo et al., 2007). Elle est exprimée par les cellules de la couche mitrales dans les BO.

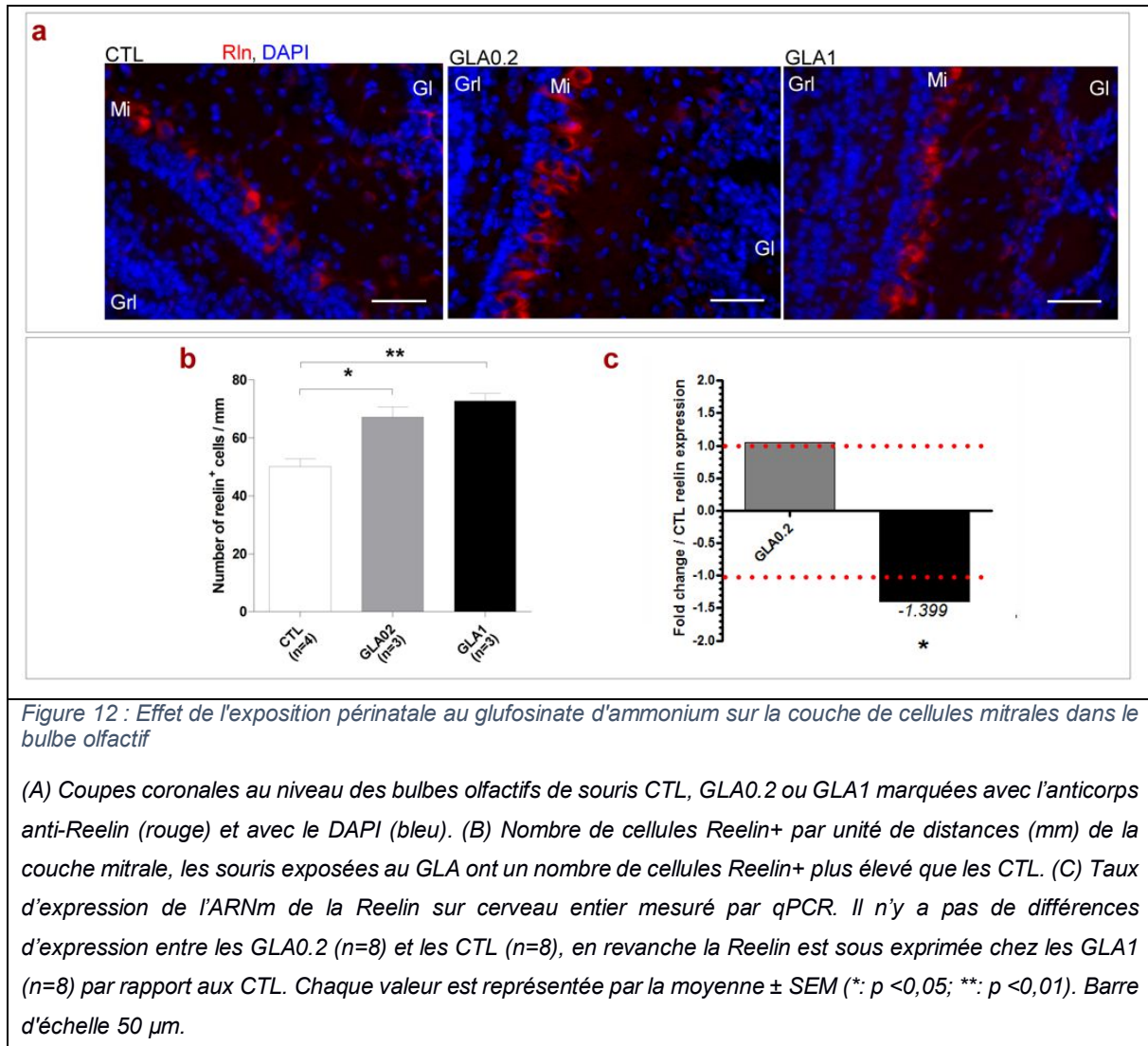
L'exposition aux organophosphorés induit des phénotypes comportementaux similaires à ceux observés chez la souris reeler (Reelin knockout) (Laviola et al., 2006), suggérant une interaction directe entre l'exposition aux pesticides et l'activité du gène *Reln* codant la Reelin. Ces données nous ont conduits à l'hypothèse que l'exposition périnatale aux organophosphorés peut affecter la migration cellulaire en modulant l'activité de la protéine Reelin, donc potentiellement contribuer au développement de pathologies neurologiques telles que de l'autisme (Keller and Persico, 2003; Mullen et al., 2013; Persico and Bourgeron, 2006).

Nous avons étudié sur des souriceaux à PND15, la structure des bulbes olfactifs qui ont un intérêt particulier pour la terminaison de la migration des neuroblastes. Pour mettre en évidence les cellules Reelin⁺, nous les avons étudiées par immunohistologie en utilisant un anticorps anti-Reelin spécifique. Chez les souris de CTL, deux régions distinctes expriment clairement la Reelin dans le bulbe olfactif (la couche glomérulaire et la monocouche de cellules mitrales) (figure 12a). Chez les souris exposées en périnatal au glufosinate d'ammonium, la couche de cellules mitrales semble être désorganisée et ne se présente plus comme une monocouche contrairement aux souris CTL (figure 12a).

En outre, Le comptage du nombre de cellules Reelin⁺ sur la couche mitrale montre une augmentation du nombre de cellules mitrales à la fois chez les GLA0.2 et les GLA1 ($p=0.0104$ pour les GLA0.2 et $p=0.0017$ pour les GLA1) (figure 12b). En effet chez les CTL on dénombre 50.18 ± 2.62 ($n=4$) cellules Reelin⁺ par mm alors qu'on en dénombre beaucoup plus chez les GLA0.2 et GLA1 (67.25 ± 3.52 ($n=3$) et 72.86 ± 2.53 ($n=3$) respectivement).

En revanche, l'analyse transcriptomique sur l'ensemble du cerveau entier montre une diminution de l'expression du gène Reelin de 40 % (-1.399 de fold

change/CTL) chez les GLA1 par rapport aux souris CTL, alors qu'aucune différence significative n'a été trouvée sur les taux de transcrits du gène *Reln* entre les CTL et GLA0.2 (figure 12c). Il faut noter que la Reelin n'est pas transcrite exclusivement dans les bulbes olfactifs, mais elle est aussi exprimée au niveau du cortex et du cervelet.



Le signal Reelin est donc important pour permettre aux neuroblastes de rompre leur formation de chaîne au niveau du neuro-épithélium et de migrer de façon radiaire vers leur destination, les différentes couches des bulbes olfactifs. Une telle perturbation au niveau de l'organisation de la couche de cellules mitrales peut affecter le processus de terminaison de migration et peut compromettre ainsi la cyto-architecture générale du bulbe. Pour voir l'impact du GLA à ce niveau, nous avons réalisé des marquages

immunohistologiques des neuroblastes toujours en cours de migration (DCX+) sur des coupes coronales des bulbes. L'analyse de ces données est purement qualitative, et est focalisée sur l'aspect général de différentes couches des bulbes olfactifs. Les résultats montrent des différences de cyto-architecture des bulbes des souris exposées au GLA. En effet, les GLA0.2 et GLA1 présentent une migration des neuroblastes qui semble être modifiée, et les neuroblastes, contrairement au CTL, ne forment plus une structure parallèle bien organisée (figure 13). Cette observation pourrait être liée à des perturbation de la voie de signalisation Reelin qui a pour rôle de coordonner le réarrangement des éléments du cytosquelette dans différents compartiments cellulaires et à différentes étapes de la migration (Ayala et al., 2011). En raison de la difficulté de quantifier cet aspect, nous avons décidé d'analyser la morphologie des neuroblastes, la migration et la formation des chaînes avec des expériences *ex vivo* utilisant des explants de la SVZ.

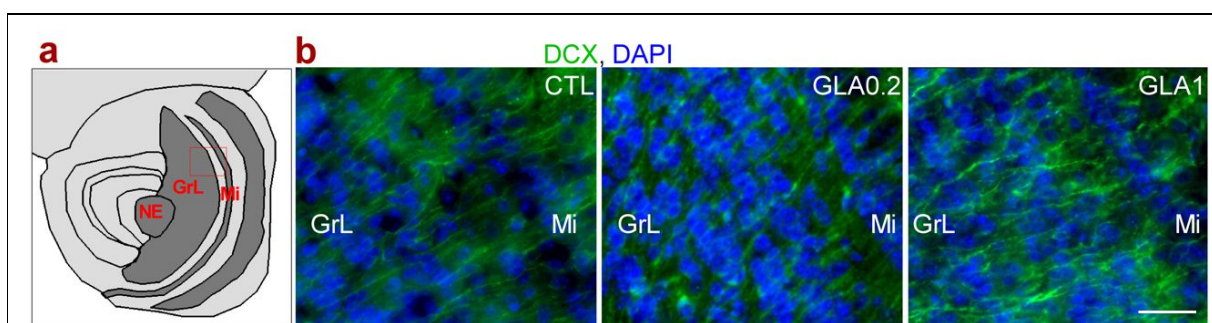


Figure 13 : Effet de l'exposition périnatale au glufosinate d'ammonium sur la Cyto-architecture des bulbes olfactifs

(A) Schéma d'une coupe coronale au niveau du bulbe olfactif d'un cerveau murin. (B) Coupes coronales au niveau des bulbes olfactifs de souris CTL, GLA0.2 ou GLA1 marquées avec l'anticorps anti-DCX (Vert) et avec le DAPI (bleu). Les bulbes des souris CTL présentent une architecture caractéristique et bien parallèle des neuroblastes qui migrent vers les couches externes des bulbes olfactifs. Les bulbes des souris exposées au GLA ont une architecture bien différente de celle des souris CTL, les neuroblastes en migration ne forment plus une architecture parallèle et bien lisse. Barre d'échelle 50 μm. **NE** : Neuroépithélium, **Mi** : couche de cellules mitrales, **GrL** : Couche Granulaire.

d) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la mort cellulaire programmée au niveau des bulbes olfactifs et dans la zone sous ventriculaire

Les neuroblastes issus de la SVZ migrent le long du courant rostral vers les BO. Une fois dans les BO, les neuroblastes intègrent le réseau neuronal et mûrent en neurones fonctionnels. Les neuroblastes n'ayant pas intégré ce réseau, meurent par apoptose cellulaire. L'analyse du taux d'apoptose au niveau de la SVZ et des BO est nécessaire pour comprendre le processus de migration chez les souris exposées en périnatal au glufosinate d'ammonium. Ces expériences sont réalisées sur des coupes coronales au niveau de la SVZ et des BO de souris à PND15 grâce à un kit de marquage de cellules apoptotiques. En effet, du côté de la SVZ, le niveau d'apoptose est augmenté significativement chez les GLA1 par rapport aux CTL ($p=0.0008$) mais on n'observe aucune différence entre les GLA0.2 et CTL (figure 14). Le nombre de cellules apoptotiques normalisé en % par rapport à la moyenne des CTL est de $100 \% \pm 2.21 \%$, $116.27 \% \pm 8.25 \%$ et $158.45 \% \pm 2.76 \%$ chez les CTL, GLA0.2 et GLA1 respectivement. Cette augmentation d'apoptose chez les GLA1 dans les zones sous-jacentes de la SVZ peut s'expliquer en partie, par la mort des neuroblastes en position ectopique.

Le comptage des cellules apoptotiques au niveau des BO n'a montré aucune différence entre les groupes au niveau des neuro-épithéliums et des couches glomérulaires des BO. Le pourcentage de cellules apoptotiques est de $100 \% \pm 10.37 \%$, $70.30 \% \pm 17.36 \%$ et $83.17 \% \pm 10.75 \%$ chez les CTL, GLA0.2 et GLA1 respectivement au niveau du neuro-épithélium ; et il est de $100 \% \pm 11.11 \%$, $73.11 \% \pm 13.28 \%$ et $86.85 \% \pm 14.60 \%$ chez les CTL, GLA0.2 et GLA1 respectivement au niveau de la couche glomérulaire des BO. En revanche, au niveau de la couche granulaire, on note une diminution significative du nombre de cellules apoptotiques chez les GLA0.2 et GLA1 ($p=0.21$ et $p=0.041$ respectivement). Le pourcentage de cellules apoptotiques normalisé par rapport au CTL est de $100 \% \pm 5.71 \%$ chez les CTL, $51.70 \% \pm 11.89 \%$ chez la GLA0.2 et $75.70 \% \pm 6.06 \%$ chez les GLA1 (figure 14).

La diminution du nombre de cellules apoptotiques dans les BO des souris exposées au GLA est synonyme d'une augmentation de survie des neuroblastes. Ces résultats confirment les résultats obtenus à l'aide du BrdU à PND15. En effet, on a

observé une diminution d'intensité chez les CTL mais pas chez les autres. L'augmentation de l'intensité de fluorescence du BrdU observée chez les groupes exposés au GLA à PND15 est donc due à un retard de migration des neuroblastes et une augmentation de survie de ces derniers.

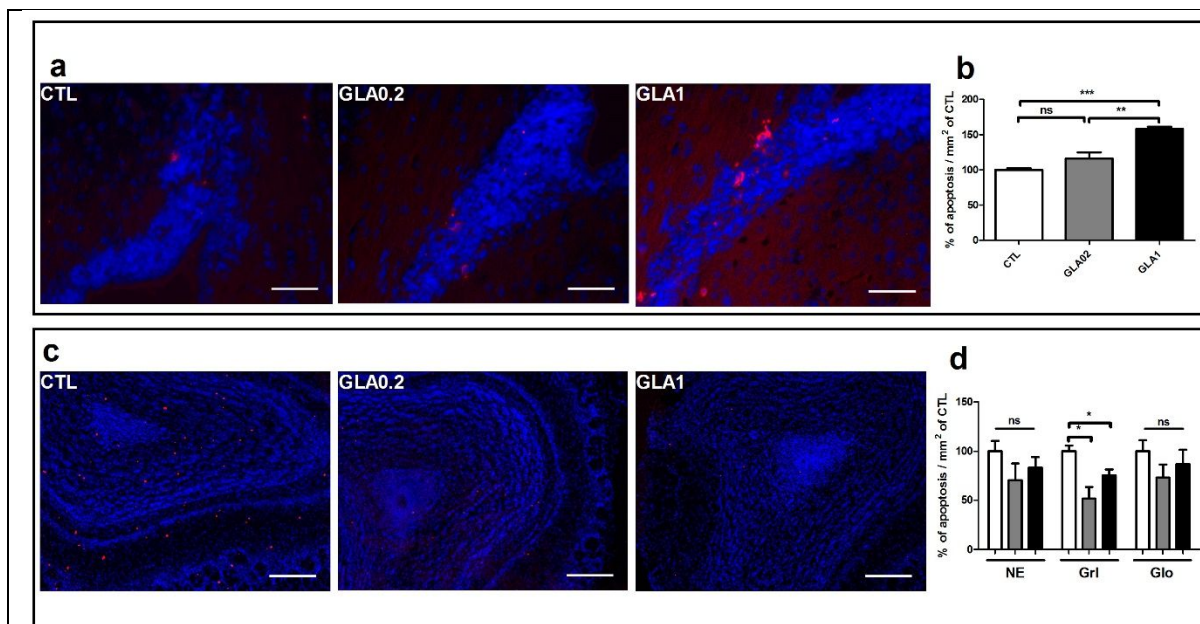


Figure 14 : Marquage des cellules apoptotiques dans la SVZ et les bulbes olfactifs

Immunomarkage des cellules apoptotiques avec le kit Apoptag® (rouge) et des noyaux au DAPI (bleu) de souris CTL, GLA0.2 et GLA1 à PND15. (A) Coupes coronales au niveau de la SVZ. (B) Nombre de cellules apoptotiques au niveau des murs ventriculaires. On ne constate pas d'augmentation de l'apoptose chez les GLA0.2 par rapport aux CTL, par contre une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques au niveau de ces murs ventriculaires chez les GLA1 comparé aux CTL. (C) Coupes coronales au niveau des BO. (D) comptage du nombre de cellules apoptotiques sur les différentes couches des BO. Pas de différence sur le nombre de cellules apoptotiques au niveau du neuro-épithélium et de la couche glomérulaire des BO, en revanche, une diminution significative de l'apoptose dans la couche granulaire des BO des animaux exposés au GLA. Chaque valeur est représentée par la moyenne $\pm$ SEM (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

e) Effets de l'exposition au glufosinate d'ammonium sur la migration des neuroblastes ex vivo sur Matrigel®

Pour étudier les aspects morphologiques de la migration des neuroblastes, nous avons mimé les conditions de cette migration et la formation des chaînes ex vivo. Nous avons cultivé des explants de la SVZ sur Matrigel® sans ajout de pesticide dans les milieux de culture. Ces explants sont issus de cerveaux de souris de 5 jours (PND5) exposés en périnatal au GLA (GLA0.2 (n=11) et GLA1 (n=7)) ou d'animaux contrôles (CTL (n=10)).

Premièrement, on a confirmé que les cellules qui quittent l'explant pour migrer en dehors de l'explant sont bien des neuroblastes par marquage immunocytologique anti-doublecortine. Les cellules des explants CTL se sont organisées en chaîne dans le Matrigel® et les cellules sont bipolaires et fusiformes en contact les unes aux autres (figure 15). Dans certains cas, on peut observer quelques cellules isolées. Nous avons évalué le nombre de chaînes par mm² et le nombre de cellules individuelles par mm². Tout d'abord nous avons observé une diminution significative ($p=0.0001$ pour les GLA0.2 et $p=0.027$ pour les GLA1) du nombre de chaînes pour les explants issus des GLA0.2 et GLA1. En effet, le nombre de chaînes formées est de 73.56 ± 6.36 par mm² chez les CTL alors qu'il n'est que de 40.95 ± 2.97 et 50.90 ± 6.20 par mm² pour les GLA0.2 et GLA1 respectivement. En outre, il est observé par rapport aux CTL (44.47 ± 5.55), une augmentation significative ($p=0.0001$ pour les GLA0.2 et $p=0.04$ pour les GLA1) du nombre de cellules individuelles des explants de GLA0.2 et GLA1 (98.44 ± 8.37 et 72.57 ± 5.52 respectivement).

Par ailleurs, les chaînes issues des explants des GLA0.2 forment des agrégats cellulaires ce qui les rendent plus compactes comparées aux chaînes du groupe CTL. En effet, on a quantifié le nombre de cellules par mm de chaîne formée et on a une augmentation significative ($p=0.008$) des GLA0.2 (116.34 ± 6.99 ($n=24$)) par rapport aux CTL (69.26 ± 4.94 ($n=24$)). En revanche, le nombre de cellules par mm de chaîne formée des explants des GLA1 est de (71.22 ± 5.15 ($n=21$)) n'est pas statistiquement différent des CTL.

L'analyse qualitative de la morphologie des neuroblastes montre chez les CTL des cellules avec un corps cellulaire allongé et fusiforme avec un cône de croissance dans la direction de migration. Cependant, un certain nombre d'explants GLA1 présente des cellules en migration avec une morphologie anormale : extension et ramification du cône de croissance, des dendrites anormalement très longues et perte de la bipolarité des neuroblastes (figure 15d).

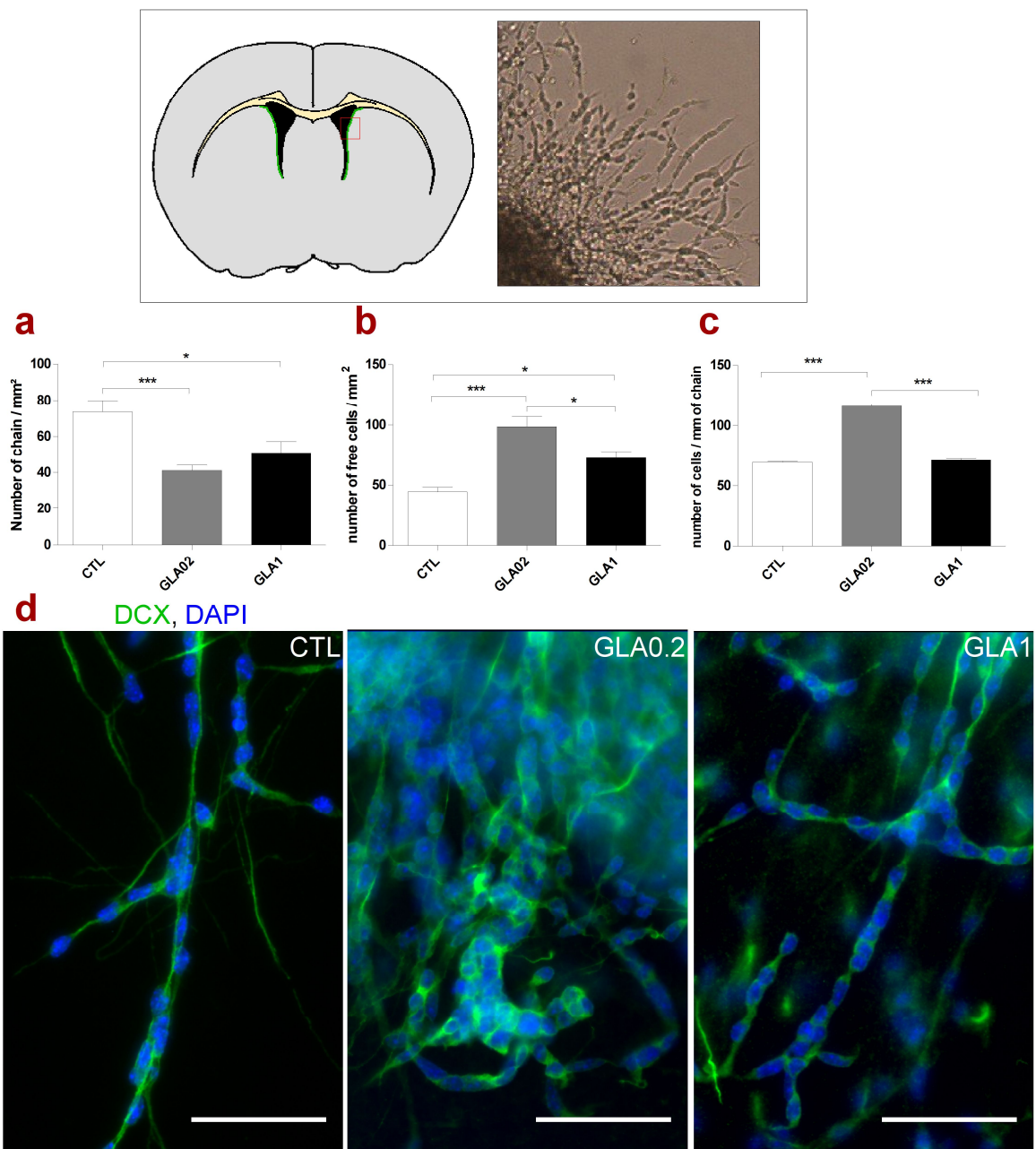


Figure 15 : Culture Ex vivo d'explants de la SVZ sur Matrigel® de souris exposées en périnatale

Des explants de la SVZ de souris de 5 jours traitées en périnatale au GLA (GLA0.2 ou GLA1) ou de souris contrôles (CTL) ont été cultivés ex vivo sur Matrigel® pendant 3 jours. Le panel du haut montre un schéma d'une coupe coronale au niveau de la SVZ, les murs ventriculaires sont colorés en vert et les explants sont micro-disséqués dans la partie désignée par un carré rouge. La photographie à droite de ce panel est une photographie obtenue avec un microscope inversé de la culture à 3DIV où on voit une partie de l'explant et des chaînes de neuroblastes qui migrent à l'extérieur de cet explant. Le nombre de chaînes formées et de cellules isolées a été compté. (A) Le nombre de chaînes formé chez les explants de souris exposées au GLA est significativement plus faible par rapport au CTL. Le nombre de cellules isolées est très élevé chez les souris exposées au GLA (B). Ces résultats montrent la difficulté des neuroblastes à migrer et à former des chaînes. (D) L'aspect morphologique des neuroblastes et des chaînes formées a été étudié par immunocytochimie anti DCX pour

marquer les neuroblastes (vert) et les noyaux au DAPI (bleu). Les résultats montrent chez les CTL des cellules bipolaires et fusiformes en contact les unes des autres contrairement au GLA0.2 et GLA1 qui montrent des extensions et des ramifications du cône de croissance, une perte de leur bipolarité et un aspect anormal et compact des chaînes. Le nombre de cellules par unité de distance a été mesuré dans les chaînes formées et les résultats montrent une augmentation significative de ce nombre chez les GLA0.2. Chaque valeur est représentée par la moyenne $\pm$ SEM (*: $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Barre d'échelle 100 μ m.

f) Analyse transcriptomique suite à l'exposition au glufosinate d'ammonium

En parallèle de nos résultats montrant des perturbations de migration, nous avons conduit une analyse transcriptomique au niveau cérébral. Des puces transcriptomiques (Affymetrix Mice Exon 1.0 ST Array) sont réalisées sur des cerveaux de souriceaux âgés de 15 jours exposés en périnatal au GLA.

Afin d'étudier plus en détail les problèmes liés à la migration des neuroblastes, nous nous sommes concentrés sur les voies de signalisation impliquées dans la migration et dans le remodelage du cytosquelette. Grâce à la base de données GSEA nous avons trouvé 494 gènes impliqués dans la structure, la biogenèse, la régulation et l'organisation du cytosquelette. De manière générale, 371 gènes sont significativement dérégulés chez les GLA0.2 et/ou GLA1 par comparaison au groupe CTL. Parmi ces 371 gènes, 122 gènes (24,7 %) présentent une dérégulation de plus de 20% (1.2 FC) (tableau 6). Pour être plus précis, 60 gènes sont dérégulés entre GLA0.2 et CTL (10 gènes sont surexprimés et 50 sous-exprimés) tandis que 73 gènes sont dérégulés entre GLA1 et CTL (37 gènes sont surexprimés et 36 sous-exprimés). Seuls 11 gènes sont dérégulés en commun à GLA0.2 et GLA1 (tableau 6, lignes grises), avec, sauf pour 1 gène, des sens de variation entre GLA0.2 et GLA1 différents. Ces résultats montrent un effet de l'exposition au GLA sur le nombre de gènes dérégulés impliqués dans la régulation du cytosquelette, mais aussi un caractère spécifique de ces dérégulations puisque, *in fine*, seul 1 gène est commun (Fscn1) en dérégulation et en sens de variations. Le traitement au GLA a donc un impact fort sur les voies d'expression du cytosquelette.

Tableau 5 : Liste des gènes dérégulés chez les GLA0.2 et GLA1 par rapport aux CTL

Transcripts Cluster Id	FC (GLA0.2 vs CTL)	Log FC (GLA0.2 vs CTL)	FC (GLA1 vs CTL)	Log FC (GLA1 vs CTL)	Gene Description	Gene Symbol
6839743	-1,20	-0,27	1,06	0,09	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	<i>Crkl</i>
6970635	-1,20	-0,27	-1,01	-0,02	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	<i>Rras2</i>
6791641	-1,62	-0,70	1,10	0,14	glial fibrillary acidic protein	<i>Gfap</i>
6905321	-1,59	-0,66	1,10	0,14	profilin 2	<i>Pfn2</i>
6964244	-1,45	-0,54	1,11	0,15	mitogen-activated protein kinase 3	<i>Mapk3</i>
6942751	-1,44	-0,52	-1,18	-0,23	guanine nucleotide binding protein, alpha 12	<i>Gna12</i>
6771558	-1,43	-0,51	1,13	0,17	dynactin 2	<i>Dctn2</i>
6819974	-1,42	-0,51	-1,07	-0,10	neurofilament, light polypeptide	<i>Nefl</i>
6787176	-1,42	-0,50	1,01	0,02	nucleophosmin 1	<i>Npm1</i>
6985399	-1,41	-0,50	1,13	0,18	breast cancer anti-estrogen resistance 1	<i>Bcar1</i>
6942654	-1,40	-0,48	-1,13	-0,18	platelet derived growth factor, alpha	<i>Pdgfa</i>
6970139	-1,38	-0,47	1,05	0,07	ADP-ribosylation factor interacting protein 2	<i>Arfp2</i>
6871078	-1,35	-0,43	1,13	0,17	kinesin light chain 2	<i>Klc2</i>
6929817	-1,35	-0,43	-1,11	-0,15	fibroblast growth factor receptor 3	<i>Fgfr3</i>
6795784	-1,33	-0,41	-1,04	-0,05	ADP-ribosylation factor 6 predicted gene 9887	<i>Arf6 Gm9887</i>
6941780	-1,33	-0,41	1,04	0,06	ras homolog gene family, member f transmembrane protein 120B	<i>Rhof Tmem120b</i>
6789344	-1,33	-0,41	-1,07	-0,10	fibroblast growth factor 11 sperm maturation 1	<i>Fgf11 Spem1</i>
6804486	-1,32	-0,41	-1,07	-0,10	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2	<i>Gdi2</i>
6837144	-1,30	-0,38	-1,06	-0,08	platelet derived growth factor, B polypeptide	<i>Pdgfb</i>
6850749	-1,30	-0,37	1,15	0,20	tubulin-specific chaperone C	<i>Tbcc</i>
6876380	-1,29	-0,37	-1,01	-0,01	Gelsolin	<i>Gsn</i>
6870125	-1,29	-0,37	-1,02	-0,03	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha 5'-nucleotidase, cytosolic II	<i>Ina Nt5c2</i>
6918036	-1,29	-0,37	1,11	0,16	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	<i>Capzb</i>
6838136	-1,27	-0,34	-1,04	-0,06	twinfilin, actin-binding protein, homolog 1 (Drosophila)	<i>Twf1</i>
6965786	-1,27	-0,34	1,01	0,01	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	<i>Mark4</i>
6848568	-1,27	-0,34	1,09	0,12	Ezrin	<i>Ezr</i>
6782572	-1,26	-0,34	-1,04	-0,05	G protein-coupled receptor kinase-interactor 1	<i>Git1</i>
6984416	-1,26	-0,33	1,16	0,21	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21	<i>Nudt21</i>
6838392	-1,25	-0,32	1,13	0,17	Rho family GTPase 1	<i>Rnd1</i>
6791204	-1,25	-0,32	-1,05	-0,07	SRC kinase signaling inhibitor 1	<i>Srcin1</i>
6784244	-1,25	-0,32	1,15	0,20	tubulin, gamma 1 tubulin, gamma 2	<i>Tubg1 Tubg2</i>

6790585	-1,24	-0,31	1,04	0,05	dynein light chain LC8-type 2	<i>Dynll2</i>
6942909	-1,24	-0,31	-1,13	-0,17	RAS-related C3 botulinum substrate 1 diacylglycerol lipase, beta	<i>Rac1 Daglb</i>
6959452	-1,23	-0,30	-1,09	-0,12	sirtuin 2 (silent mating type information regulation 2, homolog) 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Sirt2</i>
6781456	-1,22	-0,29	-1,07	-0,10	lethal giant larvae homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	<i>Lgl1</i>
6843886	-1,22	-0,29	1,04	0,06	nucleotide binding protein 1 family with sequence similarity 18, member A	<i>Nubp1 Fam18a</i>
6881787	-1,22	-0,29	-1,03	-0,04	destrin	<i>Dstn</i>
6774794	-1,21	-0,28	1,13	0,17	cyclin-dependent kinase 1	<i>Cdk1</i>
6942379	-1,21	-0,27	1,05	0,07	LIM-domain containing, protein kinase	<i>Limk1</i>
6933073	1,21	0,27	-1,16	-0,22	polycystic kidney disease 2	<i>Pkd2</i>
6897556	1,21	0,27	-1,08	-0,11	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	<i>Trpc4</i>
6899092	1,21	0,28	1,00	0,01	IQ motif containing GTPase activating protein 3	<i>Iqgap3</i>
6811117	1,22	0,28	1,03	0,04	tubulin-specific chaperone E	<i>Tbce</i>
7013165	1,24	0,31	1,20	0,26	fibroblast growth factor 16	<i>Fgf16</i>
6877080	1,26	0,33	-1,19	-0,25	Rap1 interacting factor 1 homolog (yeast) nebulin	<i>Rif1 Neb</i>
6919300	1,27	0,34	1,03	0,04	Moloney sarcoma oncogene	<i>Mos</i>
7019970	1,28	0,36	-1,19	-0,25	doublecortin	<i>Dcx</i>
6783259	1,29	0,36	1,08	0,11	tubulin, delta 1	<i>Tubd1</i>
7011964	1,35	0,43	1,03	0,04	arginine vasopressin receptor 2 Rho GTPase activating protein 4	<i>Avpr2 Arhgap4</i>
6778528	-1,20	-0,27	1,28	0,36	YKT6 homolog (<i>S. Cerevisiae</i>)	<i>Ykt6</i>
6949084	-1,21	-0,28	1,44	0,52	actin related protein 2/3 complex, subunit 4	<i>Arpc4</i>
6790294	-1,23	-0,30	1,32	0,40	chemokine (C-C motif) ligand 3	<i>Ccl3</i>
6934130	-1,23	-0,30	1,38	0,46	actin related protein 2/3 complex, subunit 3	<i>Arpc3</i>
6882627	-1,26	-0,34	1,48	0,56	myosin, light polypeptide 9, regulatory	<i>My19</i>
6879087	-1,29	-0,36	1,20	0,27	cholinergic receptor, muscarinic 4	<i>Chrm4</i>
6935370	-1,29	-0,37	-1,20	-0,26	fascin homolog 1, actin bundling protein (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	<i>Fscn1</i>
6894640	-1,30	-0,38	1,36	0,44	myosin, light polypeptide 9, regulatory	<i>My19</i>
6789444	-1,31	-0,39	1,39	0,47	profilin 1	<i>Pfn1</i>
6957763	-1,34	-0,43	1,45	0,53	Rho, GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	<i>Arhgdib</i>
6864837	-1,53	-0,62	1,25	0,32	fibroblast growth factor 1	<i>Fgf1</i>
6969916	-1,00	0,00	-1,20	-0,26	nuclear mitotic apparatus protein 1	<i>Numa1</i>
6884986	1,00	0,00	-1,24	-0,31	nebulin	<i>Neb1</i>
6748525	1,06	0,08	-1,57	-0,65	dystonin RIKEN cDNA D630036G22 gene	<i>Dst D630036G22Rik</i>
6928487	1,06	0,09	-1,42	-0,50	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	<i>Akap9</i>
6859935	1,13	0,17	-1,40	-0,49	adenomatosis polyposis coli	<i>Apc</i>
6928889	1,14	0,18	-1,40	-0,48	piccolo (presynaptic cytomatrix protein)	<i>Pclo</i>

6768609	1,02	0,03	-1,39	-0,47	ankyrin 3, epithelial	<i>Ank3</i>
6872616	1,13	0,18	-1,39	-0,47	protein kinase, cGMP-dependent, type I	<i>Prkg1</i>
6886244	1,16	0,21	-1,38	-0,47	low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors) RAN, member RAS oncogene family	<i>Lrp1b Ran</i>
7012305	1,17	0,23	-1,37	-0,45	dystrophin, muscular dystrophy	<i>Dmd</i>
6981190	-1,02	-0,02	-1,34	-0,43	hook homolog 3 (Drosophila)	<i>Hook3</i>
6759621	-1,11	-0,15	-1,33	-0,41	fibronectin 1	<i>Fn1</i>
6781941	-1,03	-0,05	-1,33	-0,41	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	<i>Myh10</i>
6804898	1,17	0,23	-1,33	-0,41	lysosomal trafficking regulator	<i>Lyst</i>
6801500	1,16	0,21	-1,32	-0,40	ninein	<i>Nin</i>
6787743	-1,05	-0,08	-1,31	-0,39	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	<i>Cyfp2</i>
6903711	1,04	0,05	-1,31	-0,38	neuroligin 1	<i>Nlgn1</i>
6863301	1,15	0,20	-1,30	-0,38	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1	<i>Rock1</i>
6828492	1,19	0,25	-1,29	-0,37	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2	<i>Rictor</i>
6947558	1,17	0,22	-1,29	-0,37	Alstrom syndrome 1 homolog (human)	<i>Alms1</i>
6941813	-1,09	-0,12	-1,27	-0,35	CAP-GLY domain containing linker protein 1 hypothetical protein LOC100503214	<i>Clip1 LOC100503214</i>
6868728	-1,10	-0,14	-1,27	-0,34	amyloid beta (A4) precursor protein binding, family A, member 1	<i>Apba1</i>
6782776	1,12	0,16	-1,26	-0,33	neurofibromatosis 1	<i>Nf1</i>
6975861	1,12	0,17	-1,26	-0,33	sorbin and SH3 domain containing 2 RIKEN cDNA D330022K07 gene hypothetical LOC100503324	<i>Sorbs2 D330022K07Rik LOC100503324</i>
6994954	-1,07	-0,10	-1,25	-0,32	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	<i>Arhgef12</i>
6836973	-1,08	-0,12	-1,25	-0,32	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	<i>Myh9</i>
6975701	1,06	0,08	-1,25	-0,32	pericentriolar material 1	<i>Pcm1</i>
6969903	-1,02	-0,03	-1,23	-0,30	nuclear mitotic apparatus protein 1	<i>Numa1</i>
6951276	1,06	0,08	-1,22	-0,29	bicaudal D homolog 1 (Drosophila)	<i>Bicd1</i>
6875722	-1,17	-0,22	-1,22	-0,29	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	<i>Abca2</i>
6795451	1,09	0,13	-1,22	-0,29	pinin	<i>Pnn</i>
6857810	1,04	0,05	-1,21	-0,27	leucine-rich PPR-motif containing	<i>Lrpprc</i>
6796380	1,20	0,26	-1,20	-0,27	actinin, alpha 1 striamin	<i>Actn1 Strm</i>
6758995	1,07	0,10	-1,20	-0,27	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human) membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)	<i>Als2 Mpp4</i>
6876154	-1,05	-0,06	-1,20	-0,26	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	<i>Abl1</i>
6916557	-1,01	-0,01	1,21	0,27	IAP promoted placental gene transmembrane protein 69	<i>Ipp Tmem69</i>
6839552	-1,19	-0,25	1,21	0,28	nuclear distribution gene E homolog 1 (A nidulans)	<i>Nde1</i>

6887836	-1,03	-0,04	1,21	0,28	WAS/WASL interacting protein family, member 1	<i>Wipfl</i>
6880587	-1,17	-0,23	1,21	0,28	HAUS augmin-like complex, subunit 2	<i>Haus2</i>
6843088	1,12	0,16	1,21	0,28	superoxide dismutase 1, soluble	<i>Sod1</i>
6946800	1,11	0,15	1,21	0,28	superoxide dismutase 1, soluble	<i>Sod1</i>
6986677	-1,16	-0,22	1,22	0,28	platelet-derived growth factor, D polypeptide	<i>Pdgfd</i>
6776507	1,09	0,13	1,23	0,30	RIKEN cDNA 4930430F08 gene centrosomal protein 290	<i>4930430F08Rik Cep290</i>
6858126	-1,03	-0,05	1,23	0,30	karyopherin (importin) alpha 2	<i>Kpna2</i>
6769179	-1,19	-0,25	1,24	0,31	calponin 2	<i>Cnn2</i>
7015993	1,11	0,16	1,24	0,32	ubiquitously expressed transcript	<i>Uxt</i>
6899767	-1,05	-0,08	1,25	0,32	integrin, alpha 10 peroxisomal biogenesis factor 11 beta	<i>Itga10 Pex11b</i>
6835329	1,13	0,18	1,26	0,33	actin-binding Rho activating protein	<i>Abra</i>
6864748	1,06	0,08	1,26	0,33	ubiquitously expressed transcript	<i>Uxt</i>
6988603	-1,14	-0,18	1,26	0,34	thymus cell antigen 1, theta	<i>Thy1</i>
6998165	-1,14	-0,19	1,27	0,35	mitochondrial ribosomal protein S22 capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	<i>Mrps22 Capza1</i>
6960328	-1,19	-0,25	1,27	0,35	Harvey rat sarcoma oncogene, subgroup R	<i>Rras</i>
6839334	-1,13	-0,18	1,28	0,36	nucleotide binding protein 1	<i>Nubp1</i>
6792994	-1,04	-0,06	1,29	0,36	profilin family, member 4	<i>Pfn4</i>
7017603	1,00	0,01	1,29	0,36	N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunitNalpha acetyltransferase 10 Rho GTPase activating protein 4	<i>Naa10 Arhgap4</i>
6996448	-1,07	-0,09	1,29	0,37	tropomyosin 1, alpha	<i>Tpm1</i>
6921068	-1,08	-0,11	1,32	0,40	dynactin 3 AT rich interactive domain 3C (BRIGHT-like)	<i>Dctn3 Arid3c</i>
6785483	-1,17	-0,22	1,32	0,40	RAS-related C3 botulinum substrate 3	<i>Rac3</i>
6818956	-1,15	-0,21	1,33	0,42	ribonuclease, RNase A family 4 angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	<i>Rnase4 Ang</i>
6784526	1,06	0,08	1,35	0,43	myosin, light polypeptide 4 lin-52 homolog (C. elegans) predicted gene 7020	<i>Myl4 Lin52 Gm7020</i>
6934584	-1,08	-0,11	1,40	0,48	RAN, member RAS oncogene family	<i>Ran</i>
6817978	-1,05	-0,07	1,42	0,51	troponin C, cardiac/slow skeletal	<i>Tnnc1</i>

* FC: Fold Change

4) Discussion

a) Le glufosinate d'ammonium perturbe la migration des neuroblastes

Le bon développement et la bonne fonctionnalité du cerveau des mammifères exigent une bonne migration des neurones à partir de leur site de neurogenèse vers leur destination finale dans le cerveau. La migration en chaîne des neuroblastes à travers le courant rostral (RMS) vers le bulbe olfactif est un système très important, car il se produit tout au long de la vie.

Au cours du développement du cerveau de souris, les deux modes de migration radiales et tangentielles assurent la formation d'une architecture neuro-anatomique bien définie du cerveau. Nous avons démontré ici que le glufosinate d'ammonium est un facteur perturbant pour les activités migratoires neuronales dans le cerveau de souris en développement. Dans notre modèle, il a été montré que la migration en chaîne des neuroblastes de la SVZ vers le bulbe olfactif le long du RMS est perturbée dans le cerveau de souris exposées en périnatal, menant à une accumulation de cellules ectopiques dans la SVZ. Une activité apoptotique élevée a été observée seulement dans la SVZ mais pas ailleurs dans le cerveau. En outre, nous avons également observé une altération de formation des chaînes de neuroblastes *ex vivo* sur Matrigel®.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques suggèrent que les pesticides causent des pathologies neurologiques dans plusieurs espèces animales et chez les Hommes (Costa, 2015; Yu et al., 2015; Zhang et al., 2015). Le GLA induit des complications neurologiques caractérisées par des pertes de conscience, des convulsions, ou des troubles de mémoire chez les patients l'ayant ingurgité (Park et al., 2006). L'exposition au glufosinate d'ammonium induit des déficits neurochimiques, neurophysiologiques et neurocomportementaux chez les rongeurs (Jeong et al., 2015; Lantz et al., 2014; Meme et al., 2009; Calas et al., 2008). Dans l'ensemble, ces études suggèrent que le GLA possède un potentiel neurotoxique significatif.

Dans notre étude, nous avons montré que l'exposition périnatale au GLA a provoqué une diminution de la neurogenèse, une augmentation de mort cellulaire au niveau de la SVZ et une augmentation de la survie cellulaire et par conséquent une

diminution de l'apoptose dans les bulbes olfactifs. Ces résultats observés dans la présente étude sont peut être le résultat des défauts de migration des neuroblastes qui provoquent une accumulation de ces cellules et une migration ectopique au niveau de la SVZ. Des résultats similaires sont observés par Alberti et ses collaborateurs dans un modèle murin avec des perturbations de la migration des neuroblastes (Alberti et al., 2005).

L'augmentation de la survie neuronale dans les bulbes des souris exposées en périnatal au glufosinate d'ammonium est due à un défaut de migration et un retard d'arrivée des neuroblastes dans les BO. Des études menées par Sui Y. et ses collaborateurs ont démontré que la réduction de la prolifération dans la SVZ et de la migration des neuroblastes augmente près de 82 % la survie de ces derniers dans les BO (Sui et al., 2012). Les mêmes résultats sont observés dans notre modèle expérimental.

Nos résultats indiquent une régulation de la neurogenèse dans le système olfactif, de telle sorte que la population neuronale dans les BO soit maintenue à un niveau stable malgré la réduction du nombre des cellules en prolifération dans la SVZ et de cellules en migration qui arrivent dans les BO.

Nos résultats sont en contraste avec les études précédentes qui utilisaient des agents qui provoquent la suppression permanente et souvent complète de la prolifération dans la SVZ. En effet, Imayoshi et ses collègues ont observé une diminution progressive des cellules granulaires dans les BO, 3-12 semaines suivant l'ablation génétique des neuroblastes nouvellement formés chez la souris adulte (Imayoshi et al., 2008). D'autres études de la neurogenèse bulbaire utilisant l'agent antiméiotique cytosine- β -D-arabinofuranoside (Ara-C) et des irradiations par des rayons X ou des rayons gamma pour restreindre la prolifération dans la SVZ (Breton-Provencher et al., 2009; Panagiotakos et al., 2007; Tada et al., 1999), montrent une réduction quasi complète des neuroblastes après une perfusion de l'Ara-C (Breton-Provencher et al., 2009), une réduction de près de 70 % de ces cellules, 7 mois après l'irradiation gamma (Lazarini et al., 2009). En conséquence, la survie prolongée des neuroblastes après une suppression partielle de la prolifération dans la SVZ ou suite à un défaut de migration peut ne pas être en mesure de maintenir un nombre normal de cellules dans les BO dans le long terme, et cela pourrait se manifester sur une

période de temps plus longue, par une réduction du nombre de neuroblastes dans le courant rostral et du nombre des interneurons matures dans les BO.

b) Le glufosinate d'ammonium perturbe la formation des chaînes de neuroblastes

La migration des neuroblastes le long du courant rostral est la plus longue distance de migration cellulaire dans le cerveau postnatal. Le courant rostral est formé par les neuroblastes originaires de la SVZ, l'une des principales niches de neurogenèse. Cette migration est essentielle pour la bonne intégration des nouveaux neurones dans le réseau synaptique et pour la régulation de la plasticité synaptique et la mémoire olfactive. Les neuroblastes glissent le long du courant rostral les uns sur les autres en formant des chaînes, et sont progressivement enfermés par un tunnel astrocytaire, tout en gardant un contact étroit avec les vaisseaux sanguins environnants.

L'aspect des cellules en migration sous forme de chaînes, nécessite certaines conditions. Ainsi, la morphologie bidirectionnelle des neuroblastes pourrait être cruciale pour l'orientation et la qualité de la migration (Davy and Robbins, 2000; Koshida, 2005). Même si nos expériences sont faites *ex vivo*, les neuroblastes ont une capacité intrinsèque à migrer sur le Matrigel®, comme en témoigne leur comportement migratoire observé dans nos expériences. Une réorganisation du centrosome et de l'appareil de Golgi est nécessaire pour initier la migration. Si l'on compare la morphologie des neuroblastes qui ont été en contact avec le glufosinate avec les données de la littérature concernant leurs caractéristiques de maturation, il semblerait qu'ils soient bloqués dans le stade correspondant à ce qui est décrit comme étant la phase intermédiaire (Ghashghaei et al., 2007). En effet, leur morphologie très arborisée avec des prolongements longs ressemble à ce stade de maturation. Le fait que l'exposition au glufosinate affecte l'expression de gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette (Kif, Rho, ...), pourrait conduire à la perturbation de cette réorganisation. Par ailleurs, la formation des chaînes est fortement associée aux interactions entre cellules. Là encore, nos observations *in vivo* et *ex vivo* semblent conforter l'idée que les modifications transcriptomiques de gènes impliqués dans ces interactions cellule-cellule affectent bel et bien leurs capacités de regroupement et de migration coordonnées.

Ces différentes altérations peuvent expliquer en partie les défauts observés dans la migration des neuroblastes et la formation des chaînes. Il nous paraît évident que le GLA perturbe les voies qui régulent ces mécanismes.

c) L'augmentation de la Reelin dans les bulbes, un système de compensation?

Dans notre modèle expérimental, nous avons observé une augmentation du nombre de cellules Reelin+ au niveau des couches de cellules mitrales au niveau des bulbes olfactifs. La Reelin est essentielle pour le développement neurologique et notamment pour la migration neuronale. Elle agit à différents endroits du cerveau. Elle régule l'orientation cellulaire des neurones et régule plusieurs aspects du développement et de la migration telle que la translocation terminale des neuroblastes au niveau des bulbes et l'activation de plusieurs molécules d'adhésion régulées par la signalisation Dab1 (Jossin and Cooper, 2011). La Reelin est une molécule chémoattractante et induit également le détachement des neuroblastes pour sortir du RMS et entamer une migration radiaire dans les BO (Simo et al., 2007).

L'ajout de cette protéine dans une culture de neuroblastes *in vitro* empêche la formation de chaînes de ces derniers et une perturbation au niveau de cette protéine (chez la souris reeler par exemple) induit des accumulations ectopiques des neuroblastes et un défaut de passage de la migration tangentielle à la migration radiaire (Sun et al., 2010).

L'augmentation du nombre de cellules Reelin+ dans les bulbes olfactifs des souris exposées au glufosinate d'ammonium pourrait être un mécanisme de compensation pour pallier le retard de migration et d'arrivée des neuroblastes dans les bulbes olfactifs. Cette augmentation interviendrait aussi dans le but d'augmenter les transmissions glutamatergiques pouvant être perturbées par le pesticide qui est, pour rappel, un analogue du glutamate. En effet, plusieurs études ont montré que la Reelin augmente la transmission glutamatergique *in vivo* (Teixeira et al., 2011) surtout pendant le développement (Chen et al., 2005; Groc et al., 2007; Herz and Chen, 2006; Qiu et al., 2006).

d) Le glufosinate d'ammonium et le glutamate

Le GLA appartient au groupe des pesticides organophosphorés, mais contrairement à la plupart de ces composés son mécanisme d'action n'est pas l'inhibition de l'acétylcholinestérase, mais plutôt de la glutamine synthétase (Hack et al., 1994). En outre, le GLA est un analogue structurel d'un neurotransmetteur, le glutamate. Par conséquent, il peut affecter certains des processus dans le système nerveux en développement qui impliquent normalement le glutamate. Cela est d'autant plus vrai que le GLA administré à la mère a été détecté chez le fœtus, indiquant qu'il traverse la barrière placentaire (KEMI, 2002). Par conséquent, le glufosinate d'ammonium peut avoir des effets directs et/ou indirects. Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur et son activité module de nombreux procédés, y compris le développement et la morphologie neuronale, la croissance de dendrites, la différenciation synaptique et l'activité spontanée, par son action sur les récepteurs au glutamate. Il a déjà été décrit récemment que le GLA est capable de se lier directement sur les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) *in vitro* et d'augmenter l'activité neuronale (Lantz et al., 2014). Plusieurs études ont déjà montré que le GLA peut agir par l'intermédiaire des récepteurs NMDA pour induire des pathologies cérébrales telles que des crises d'épilepsie (Lapouble et al., 2002; Matsumura et al., 2001).

En outre, les effets néfastes d'une exposition périnatale au GLA sur le développement du système glutamatergique n'est pas connue, une seule étude a abordé ce point dans le passé par l'évaluation de l'effet de l'exposition précoce au GLA sur les récepteurs de l'acide kaïnique dans le SNC de la progéniture (Fujii, 1997). Leurs résultats suggèrent que l'exposition aux GLA, même à faibles doses, pendant la période infantile chez le rat induit des altérations dans les récepteurs de l'acide kaïnique dans le cerveau (Fujii, 1997). Nous avons montré dans cette étude que le gène GRIN2B (codant pour la sous-unité NR2B du récepteur NMDA) est régulé à la baisse dans le cerveau de souris GLA1, ce qui suggère que le pesticide est capable de perturber la neurotransmission glutamatergique dans le cerveau en développement. Fait intéressant, de nombreuses études ont rapporté des mutations rares dans le gène GRIN2B chez les individus atteints d'autisme. Par exemple, Myers et al., ont trouvé des mutations dans GRIN2B à la fois dans des cas d'autisme et de schizophrénie (Myers et al., 2011), Talkowski et ses collaborateurs, ont trouvé deux CNV impliquant GRIN2B chez des patients avec des troubles du spectre autistique

(Talkowski et al., 2012). Plus récemment, Freunscht et ses collaborateurs, ont observé un lien étroit entre une déficience intellectuelle et des mutations GRIN2B (Freunscht et al., 2013).

e) Le glufosinate d'ammonium et les perturbations transcriptomiques

L'identification des voies de signalisation spécifique à la migration des neuroblastes qui seraient perturbées par l'exposition au GLA n'est pas une tâche facile. Les différents mécanismes de la migration sont très bien décrits dans divers types cellulaires (Gong, 2014; Hippenmeyer, 2014; Kuriyama and Mayor, 2008; Kwan et al., 2012; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Mayor and Thevenneau, 2014).

Les travaux de Young ont permis de déterminer un ensemble de différentes molécules impliquées et/ou régulant la migration neuroblastique. Le tableau 7 résume un certain nombre d'entre elles (Young et al., 2011).

Tableau 6 : Molécules régulant la migration neuroblastique

Families of molecules	Constitutive SVZ-RMS-OB migration
Chemoattractant (ligand/receptor)	BDNF/TrkB ← GDNF/GFR α 1 VEGF/VEGFR-1,2 ProK2/ProKR2 Netrin-1 Anosmin-1 HGF/Met SHH/Patched ? ? ? ?
Chemorepellant (ligand/receptor)	Slit1,2/Robo2,3
Signaling (ligand/receptor)	Ephrin-B2/EphB2 ← Reelin/disabled ← Neuregulin/ErbB4 ← EGF/ErbB1 ← FGF2/FGFR1 NPY/Y1 NCAM/NCAM ← PSA-NCAM α 6 β 1 Integrin/Laminin ← Tenascin ← Connexins 43 & 45 ? GABA ← Glutamate ← Dex
Adhesion (ECM or homotypic)	
Matrix metalloproteinases	
Neurotransmitters	
Cytoskeletal Proteins	

Les flèches rouges indiquent les protéines dont l'expression transcriptomique cérébrale à P15 a été significativement altérée chez les animaux exposés durant la période périnatale

L'étude transcriptomique réalisée au laboratoire a mis en évidence des dérégulations significatives de l'expression de nombreux gènes impliqués dans diverses voies, et en particulier toute une série de gènes impliqués dans la migration des neuroblastes, leur maturation, et/ou dans le fonctionnement et la structure de synapses.

Ces données ont montré, par exemple, des dérégulations d'expression des protéines NCAMs qui sont responsables de l'adhésion et des interactions avec la matrice extracellulaire. D'autres protéines impliquées dans le même mécanisme comme les tenascines, la neurexine, l'astrotactine sont aussi affectées par cette baisse d'expression. On peut aussi noter que l'exposition au glufosinate perturbe l'expression de certains gènes impliqués dans la migration et dans le guidage comme les récepteurs aux ephrines, le facteur Rho-A, qui est un facteur clé dans la régulation de polymérisation et dépolymérisation d'actine et donc dans l'orientation de la migration. L'expression d'autres protéines qui sont aussi impliquées dans la migration neuroblastique baisse significativement après l'exposition au glufosinate comme les protéines Kif, neurofascine et les semaphorines.

Après une analyse détaillée des différents gènes dérégulés et leurs implications dans les différentes voies de signalisation, nous avons pu constater que certains gènes couramment dérégulés revêtent une importance cruciale (figure 15). Parmi les 11 gènes dérégulés en commun, on note la dérégulation du complexe ARP (Arpc3 et Arpc4) impliqué dans la croissance des filaments d'actine permettant l'allongement rapide de ces filaments (Alberts B. et al., 2002). On note aussi la dérégulation d'expression d'autres protéines comme PFN (Pfn1, Fscn1) intervenant dans la migration et la prolifération des cellules non musculaires (Wang et al., 2014), MLC (My19) régulant la contraction du cytosquelette, GF (FGF1) qui régleme l'organisation du cytosquelette et la contraction du collagène (Ding et al., 2000), GPCR/chimiokine (Chrm4 et Ccl3) qui intervient dans le chimiotactisme de la migration des cellules et les mouvements d'actine et du cytosquelette (Yan and Jin, 2012), le système de Rac/Ras (ARHGDI1) qui contrôle la polymérisation et dépolymérisation du cytosquelette d'actine en réponse à des signaux extracellulaires (Ory et al., 2000). Cependant, les variations d'expression de ces gènes sont différentes dans les deux groupes traités au GLA ; 10 gènes sur 11 étaient sous-exprimés chez

les GLA0.2 et surexprimés chez les GLA1, alors que seulement 1 gène (Fscn1) était sous-exprimé dans les deux conditions.

Ces données soulignent l'effet du GLA sur le cytosquelette, et cela conduit à des dérégulations spécifiques avec seulement quelques gènes dérégulés en commun. Les résultats globaux renforcent nos données obtenues sur les cultures *ex vivo* montrant des morphologies différentes des chaînes de neuroblastes avec GLA0.2 ou GLA1 (figure 15). En effet, on pourrait poser l'hypothèse sur les morphologies anormales des chaînes de neuroblastes, avec la formation d'agrégats chez les GLA0.2 et les ramifications ainsi que les longues extensions du cône de croissance chez les GLA1, pourraient être dues à la différence du profil d'expression observé entre les GLA0.2 et GLA1.

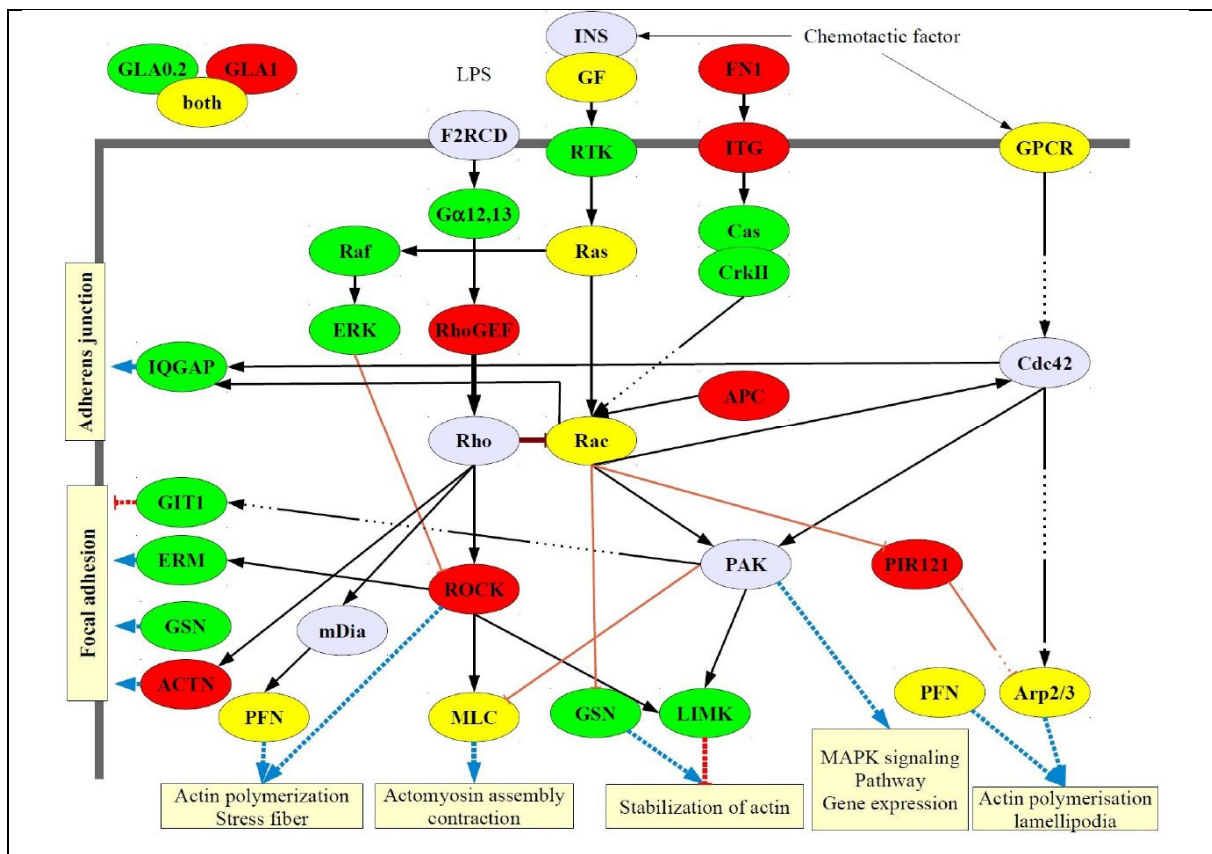


Figure 16 : Voies de signalisation impliquant le remodelage du cytosquelette

Dans ce schéma, on note un nombre important de gènes dérégulés qui sont impliqués dans la migration cellulaire et de la dynamique du cytosquelette suite à l'exposition périnatale au glufosinate d'ammonium. Ces dérégulations peuvent engendrer des problèmes au niveau de la migration cellulaire et d'adhésion et même du transport vésiculaire dans la cellule. En vert : les protéines dont l'expression est dérégulée chez les GLA0.2. En rouge : les protéines dont l'expression est dérégulée chez les GLA1. En jaune : les protéines dont l'expression est dérégulée dans les deux groupes GLA0.2 et GLA1. Figure réalisée par S. Mortaud.

Le Glufosinate d'ammonium et le cytosquelette

Le Glufosinate d'ammonium et le cytosquelette

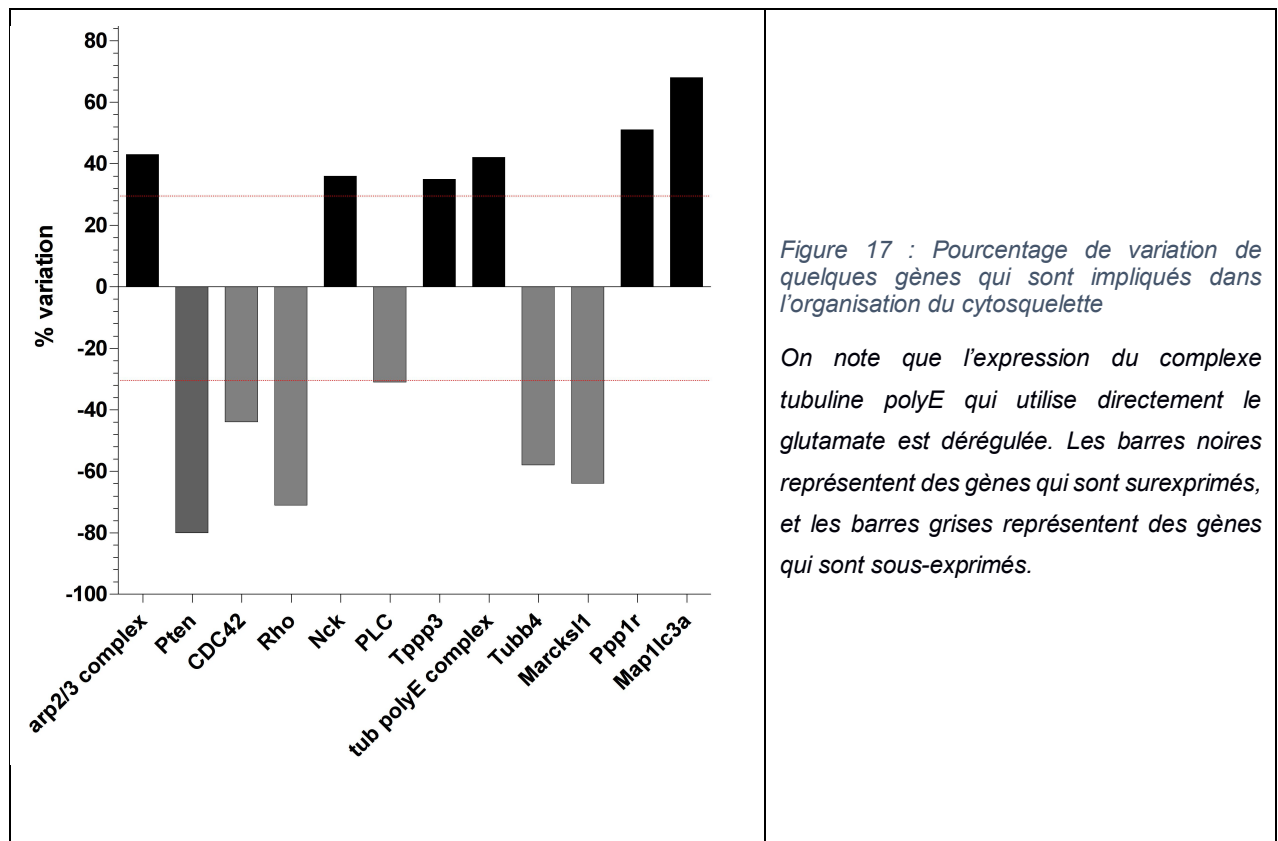
1) Introduction

Le glutamate est un acide aminé présent dans presque toutes les protéines dans les principaux organes comme les muscles, le cerveau, les reins et le foie. Il joue un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de nombreux organes y compris le cerveau. Le glutamate intervient dans de nombreux processus et métabolismes comme la neurotransmission, la migration cellulaire mais aussi dans la structure du cytosquelette. Au niveau de ce dernier, le glutamate entre dans le phénomène de polyglutamylation qui consiste à ajouter des résidus de glutamate sur les microtubules de la tubuline.

La polyglutamylation (polyE) est essentielle pour la stabilisation du cytosquelette et intervient notamment dans la division, la migration et la différenciation cellulaire. Ce phénomène est un phénomène réversible, et toute perturbation de ce système peut avoir des conséquences sur la prolifération, le mouvement cellulaire ou sur la maturation. La polyE de la tubuline peut donc être une cible possible du GLA.

Le GLA, étant un analogue structural du glutamate, peut donc interférer dans la polyglutamylation, soit en interagissant avec les chaînes de glutamate sur la tubuline et bloquer ainsi le processus dynamique et réversible de la polyglutamylation, soit en interagissant avec les enzymes responsables de la polyglutamylation qui utilisent le glutamate comme substrat (Tubulin Tyrosine Ligase-Like ou TTL) ou avec les enzymes responsables de la déglutamylation (Cytosolic Carboxy Peptidases ou CCP).

Nous avons déjà démontré que l'exposition à faibles doses du GLA chez la souris induit des altérations dans la migration des neuroblastes de la SVZ vers les BO avec une altération de la prolifération au niveau de cette zone. L'étude transcriptomique nous a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression d'un certain nombre de gènes qui sont impliqués dans la dynamique du cytosquelette et de la migration cellulaire (figure 16) et un de ces gènes concerne le complexe de polyE (figure 17).



Pour étudier plus en détail l'implication du GLA dans les phénomènes de polyE, nous avons choisi de travailler sur un modèle cellulaire *in vitro* (lignée cellulaire C6 de rat). Le choix de ce modèle est plus particulièrement intéressant, car ce sont des cellules avec un fort pouvoir prolifératif, qui sont capables de se différencier en neurone-like avec des pseudos dendrites qui sont fortement polyglutamylées. Par conséquent, notre objectif général était d'étudier la cytotoxicité du GLA et ses effets sur le réseau du cytosquelette et d'élucider ses mécanismes d'actions.

2) Matériel et méthodes

a) Culture cellulaire et traitement

Les cellules C6 sont des cellules de glioblastome de rat (LGC Promochem, Molseim, France) ont été incubées avec du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO) complémenté de 1 g/l de glucose, 10 % de SVF, (GIBCO), 0.5 mM de L-glutamine (GIBCO) et des antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine, GIBCO) dans un incubateur à 37 °C, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ (RS Biotech 1 000 mg de glucose (Sigma). Les cellules sont repiquées 2 fois par semaine après avoir atteint 90-95% de confluence. Les cellules sont lavées deux fois avec une solution de Hanks (GIBCO) et ont été détachées avec de la trypsine-EDTA (GIBCO), puis centrifugées à 900 rpm/2 minutes à 4 °C. Le culot cellulaire a été remis en suspension dans du DMEM complet et réensemencé à 50.103 cellules/ml.

Une préparation d'une solution mère à 1 M de GLA dans de l'eau est utilisée pour les traitements des cultures à quatre concentrations différentes, 1, 3, 10 et 100 µM. Pour induire la différenciation des cellules C6, 2 mM de sodium butyrate (SB) (sigma) sont ajoutés dans le milieu de culture.

b) Mesure de la Cytotoxicité (test MTT)

Les tests MTT ont été menés pour déterminer la cytotoxicité du GLA sur les cellules C6. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de culture 6 puits (50 103 cellules/mL) dans du DMEM complet puis mises en culture pendant 48 heures avec différentes concentrations de GLA ajouté aux cultures (CTL : 0 µm, GLA1 : 1 µM, GLA3 : 3 µM, GLA10 : 10 µM, et GLA100 : 100 µM). Pour déterminer la cytotoxicité du GLA, le réactif MTT est utilisé. En bref, les cultures sont lavées avec du milieu de Hanks et 962 µL de DMEM neuf et 192 µL de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) ont été ajoutés dans chaque puits. L'incubation se fait à 37 °C pendant 4 heures. Après 962 µL de solution de solubilisation (SDS sodium dodecyl sulfate) ont été ajoutés dans chaque puits, une étape d'incubation a été effectuée à 37°C pendant 1 heure. Les cellules ont été homogénéisées, centrifugées (15000g/10minutes) puis la densité optique de chaque échantillon est mesurée par

spectrophotométrie à 562 nm (CLARIOstar, BMG LABTECH). Les résultats des tests MTT sont exprimés par pourcentage d'absorbance par rapport au CTL.

c) Immunocytologie

Pour les marquages immunocytologiques, des cultures cellulaires sont réalisées dans des boîtes de 24 puits sur des lamelles et traitées avec différentes concentrations de GLA pendant 48 heures. Les cultures sont ensuite arrêtées puis lavées au TBS et fixées au PFA 4 %/10 minutes. Une fois fixées, les cultures cellulaires sont rincées trois fois au TBS, ensuite les lamelles sont incubées avec une solution de saturation qui contient 10 % de SVF, 1 % de BSA et 0,2 % de Triton X-100 pendant 20 minutes. Les lamelles sont ensuite incubées 1 heure avec les anticorps primaires (IgG de lapin anti-tubuline, IgG de souris anti-tubuline polyglutamylées) dilués au 1/1000^{ème} dans la solution de saturation. Après rinçage au TBS, les lamelles sont ensuite incubées 30 minutes, à l'abri de la lumière, avec les anticorps secondaires couplés au fluorochrome (anti-IgG de souris couplé avec l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen) dilués au 1/1000^{ème} et anti-IgG de lapin couplé avec le fluorochrome TRITC dilué au 1/100^{ème}). Les lamelles sont rincées dans le TBS. Un marquage nucléaire est ensuite effectué avec une solution de DAPI (Sigma) suivi d'un lavage au TBS. Pour le montage des coupes, un milieu de montage, le Fluoromount-G (SouthernBiotech), est employé.

d) Semi quantification des taux protéiques

Des cultures cellulaires de C6 traitées ou non au GLA sont utilisées pour l'extraction des protéines avec du tampon RIPA (10 mM TrisHCl, pH 7.6; 1 mM EDTA; NaCl 0.15 mM; Igepal 1 %; SDS 0.2 %; supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Pierce)). Une centrifugation (15 000 g/ 30 minutes à 4 °C) est réalisée afin d'éliminer les débris. La concentration protéique est déterminée avec le kit BCA protein assay kit (Pierce). Des aliquots de protéines (15-30 µg) sont dénaturés à 95 °C pendant 5 minutes avant d'être déposés sur un gel SDS-page 12 %. Après une migration électrophorétique (2 heures à 100 volts), un transfert en milieu semi-sec est réalisé sur une membrane de nitrocellulose (5 mA/cm² pendant 20 minutes). Les membranes sont ensuite incubées dans une solution de blocage (lait 5 %, TBS-T

0.1 %) durant toute une nuit à 4 °C sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées dans la solution de saturation contenant l'anticorps primaire spécifique à la protéine recherchée. Après plusieurs lavages dans le tampon TBS-T les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à une enzyme peroxydase HRP. La révélation des protéines d'intérêt est réalisée par chimioluminescence à l'aide du kit de réactif ECL (Enhanced ChemiLuminescent, Amersham). La révélation et la quantification des bandes immunoréactives sont réalisées avec un imageur de Western Blot (Pxi imaging, Syngene). L'ensemble des expériences ont été répliquées trois fois et les niveaux de protéines sont normalisés par rapport à une protéine de références, la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

e) Observations microscopiques

Les images ont été acquises sur un microscope à fluorescence (Leica DM6000b) avec une caméra DFC310FX (Leica) et le logiciel Metamorph®. Pour chaque section au moins une photographie de chaque structure a été réalisée. Les images sont ensuite analysées plus en détails par le logiciel ImageJ® (NIH).

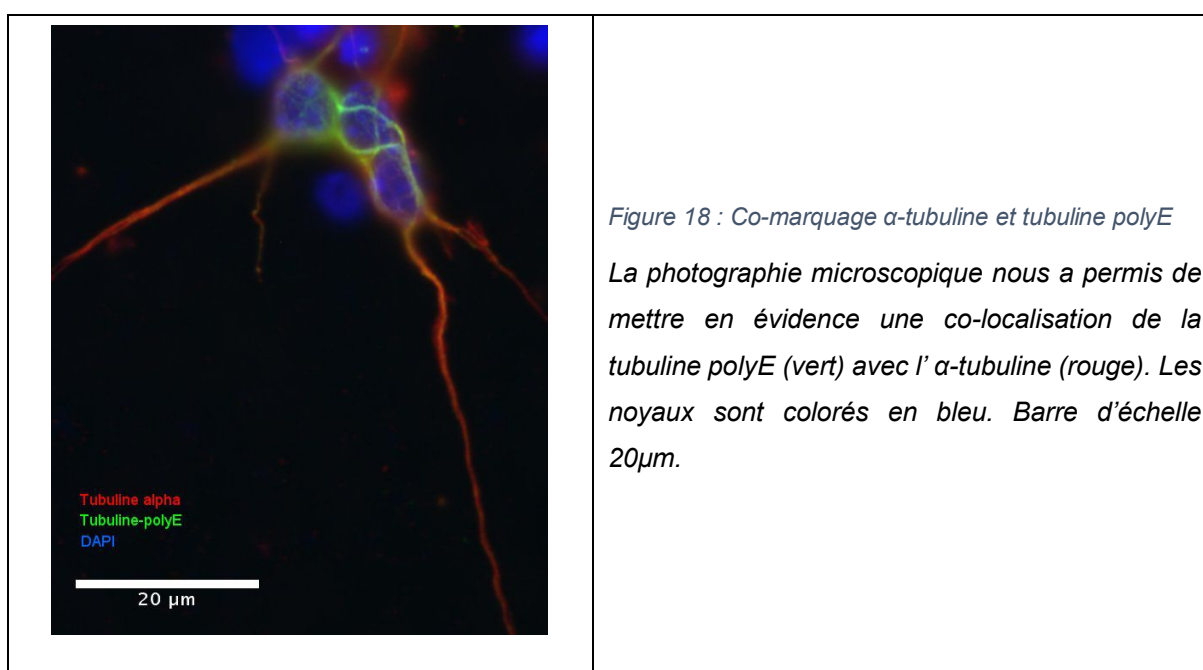
f) Analyses statistiques

Pour l'analyse statistique, les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ l'erreur standard moyenne (SEM). Les données impliquant plus de deux groupes ont été analysées par analyse de variance ($P < 0.05$, ANOVA), les données ont été rassemblées pour chaque groupe. Le test (t) de Student a été utilisé pour les comparaisons impliquant deux groupes. La signification a été fixée à $p < 0,05$.

3) Résultats

a) Co-localisation de la tubuline polyE avec l' α -tubuline

Premièrement, nous avons cherché à valider notre modèle et confirmer la présence de la polyglutamylation au niveau des microtubules de ces cellules. Un co-marquage immunocytologique anti α -tubuline (rouge) et anti tubuline polyE (vert) nous a permis de mettre en évidence la co-localisation de la tubuline polyE sur l' α -tubuline. Les observations sont présentées dans la figure 18.



b) Cytotoxicité du GLA

Le test de viabilité cellulaire ou de cytotoxicité est souvent utilisé pour déterminer si des composés comme le GLA ont des effets cytotoxiques directs qui conduisent à la mort cellulaire. L'intensité de coloration (relative à la quantité de formazan formé) est représentative du nombre de cellules viables. L'ajout du GLA sur 48 heures dans les milieux de culture n'affecte pas la viabilité des cellules. En effet, aucune différence significative n'est observée entre les différentes concentrations de GLA. Les valeurs sont de : $99.9 \pm 3.53 \%$; $104.5 \pm 10.7 \%$; $103.1 \pm 14.5 \%$ et $84.2 \pm 9.8 \%$ pour les GLA1, GLA3, GLA10 et GLA100 respectivement (figure 19).

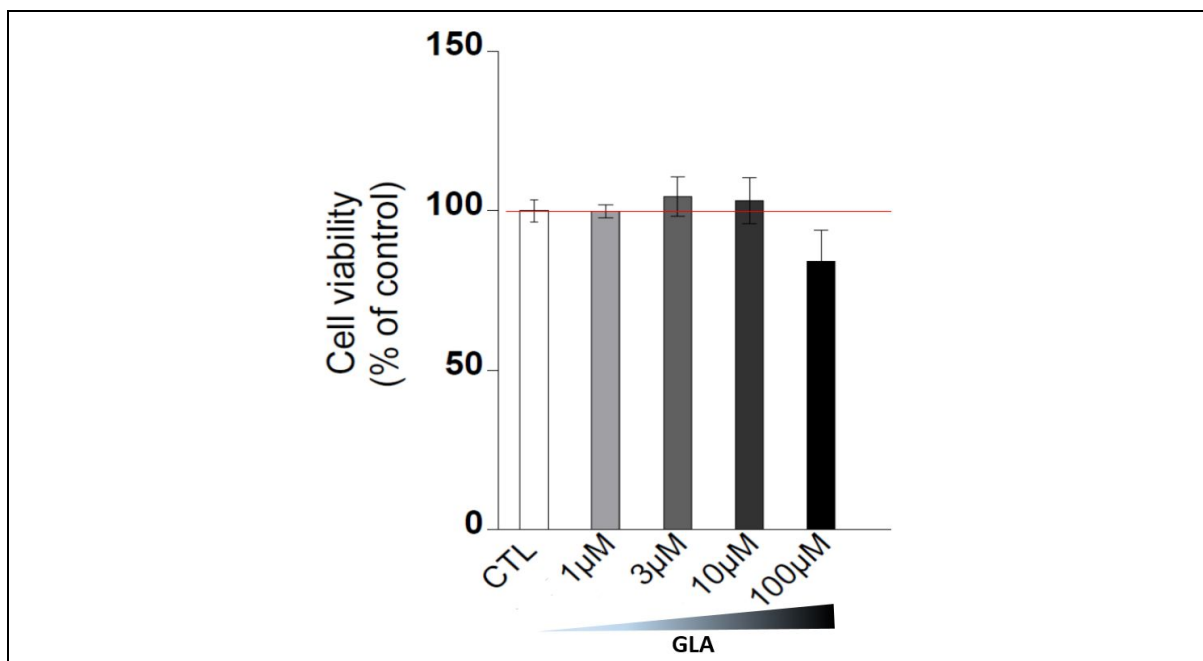


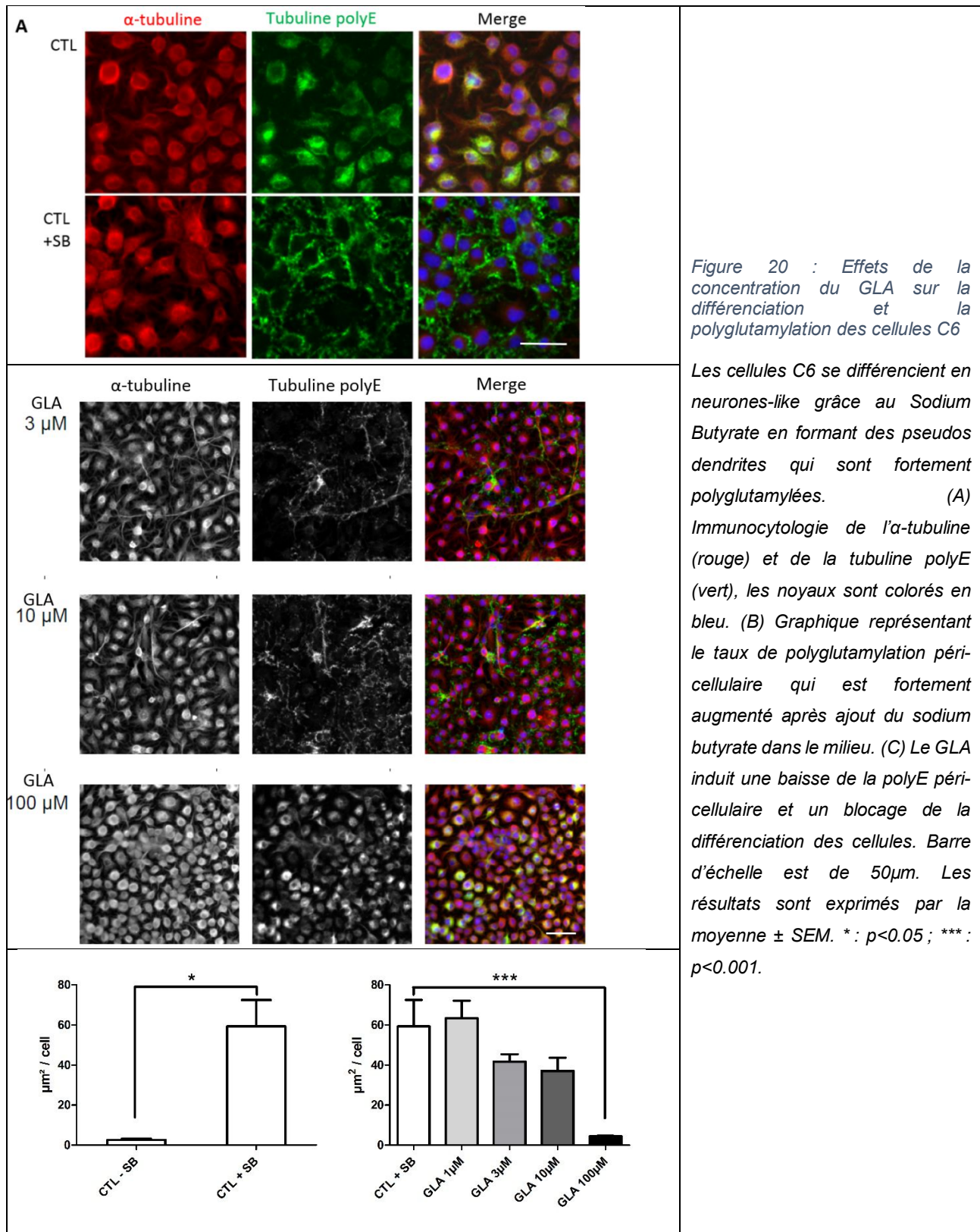
Figure 19 : Test de cytotoxicité du GLA sur les cultures de cellules C6

50.10³ cellules sont mises en culture avec différentes concentrations du GLA (0μM, 1μM, 3μM, 10μM et 100μM) pendant 48h. La viabilité cellulaire est mesurée via le test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'absorbance par rapport au CTL. Les résultats montrent que le GLA n'est pas cytotoxique pour les C6 sur 48h. Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM.

c) Différenciation des cellules C6 et polyglutamylation

Pour pousser les cellules C6 à se différencier en neurones-like, nous avons utilisé le sodium butyrate (SB). Une fois les cellules différenciées, elles forment des pseudos dendrites qui sont fortement polyglutamylées en raison de la stabilisation des microtubules nécessaire à la différenciation cellulaire (figure 20a). Nous avons donc mesuré la surface péri-centrique des cellules qui sont polyglutamylées à l'aide du logiciel ImageJ®. Pour ce faire, nous avons soustrait le marquage α-tubuline du marquage polyE puis la surface du marquage restante est mesurée, ensuite divisée par le nombre de cellules. Le marquage polyE péri-centrique est fortement augmenté après la différenciation ($p = 0.014$) (après ajout de SB) des cellules CTL (figure 20b). En effet, la surface mesurée passe de $2.63 \pm 0.7 \mu\text{m}^2/\text{cell}$ avant ajout de SB à $59.3 \pm 13.18 \mu\text{m}^2/\text{cell}$ après différenciation. La surface de polyglutamylation mesurée et donc au nombre de cellules différenciées est inversement proportionnelle aux concentrations GLA. En effet, les surfaces péri-cellulaires polyglutamylées mesurées sont de $59.31 \pm 13.18 \mu\text{m}^2/\text{cell}$, $63.35 \pm 8.74 \mu\text{m}^2/\text{cell}$, $41.73 \pm 3.62 \mu\text{m}^2/\text{cell}$,

37.07 ± 6.57 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ et 4.45 ± 0.24 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ pour les CTL, GLA1, GLA3, GLA10 et GLA100 respectivement (figure 20c).



d) Effets du glufosinate d'ammonium sur la croissance des C6

Pour étudier les effets du glufosinate d'ammonium sur la prolifération cellulaire, nous avons réalisé des courbes de croissance sur huit jours avec différentes concentrations de GLA dans les milieux de cultures (CTL : 0 μ M, GLA1 : 1 μ M, GLA3 : 3 μ M, GLA10 : 10 μ M et GLA100 : 100 μ M).

Les résultats ne montrent aucune différence significative entre la courbe CTL et GLA1, en revanche, à partir de 3 μ M de GLA, on a une baisse significative de prolifération et un décrochement de la courbe de croissance à J5. Le glufosinate d'ammonium perturbe donc la prolifération cellulaire à partir de 3 μ M dans le milieu de culture (figure 21).

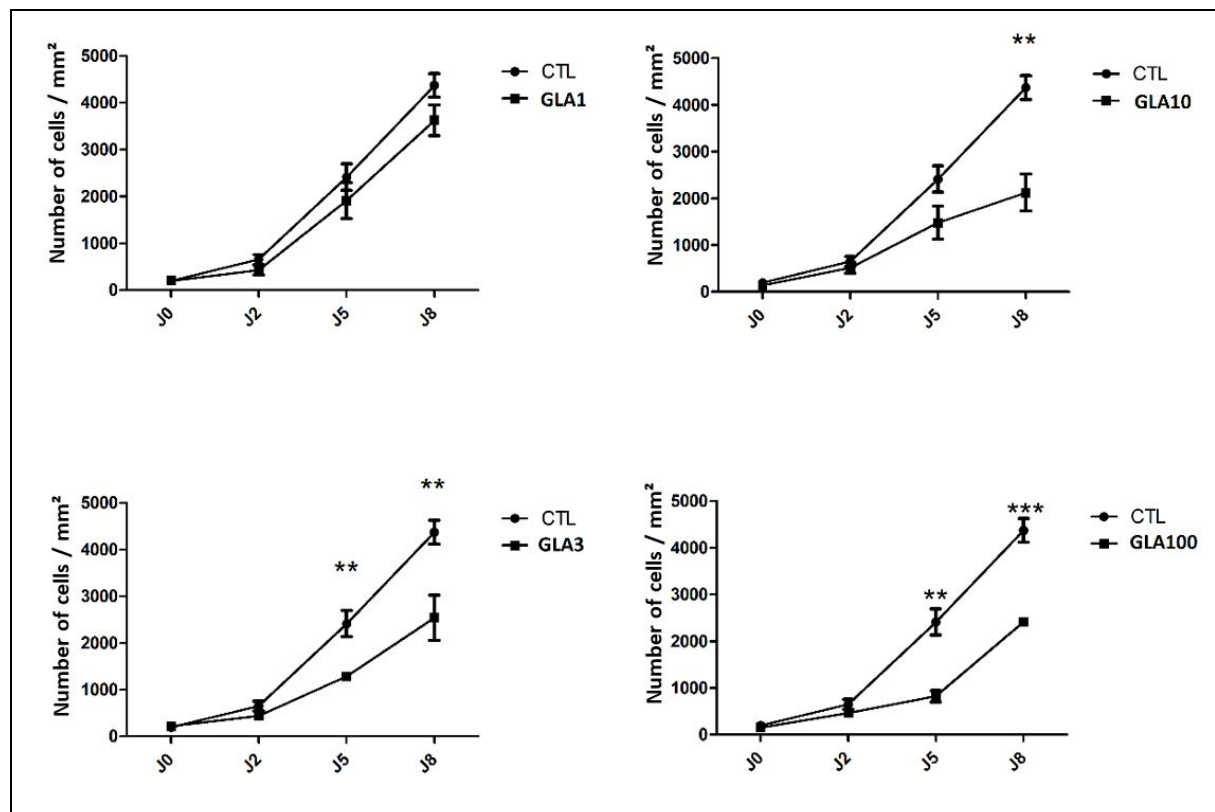
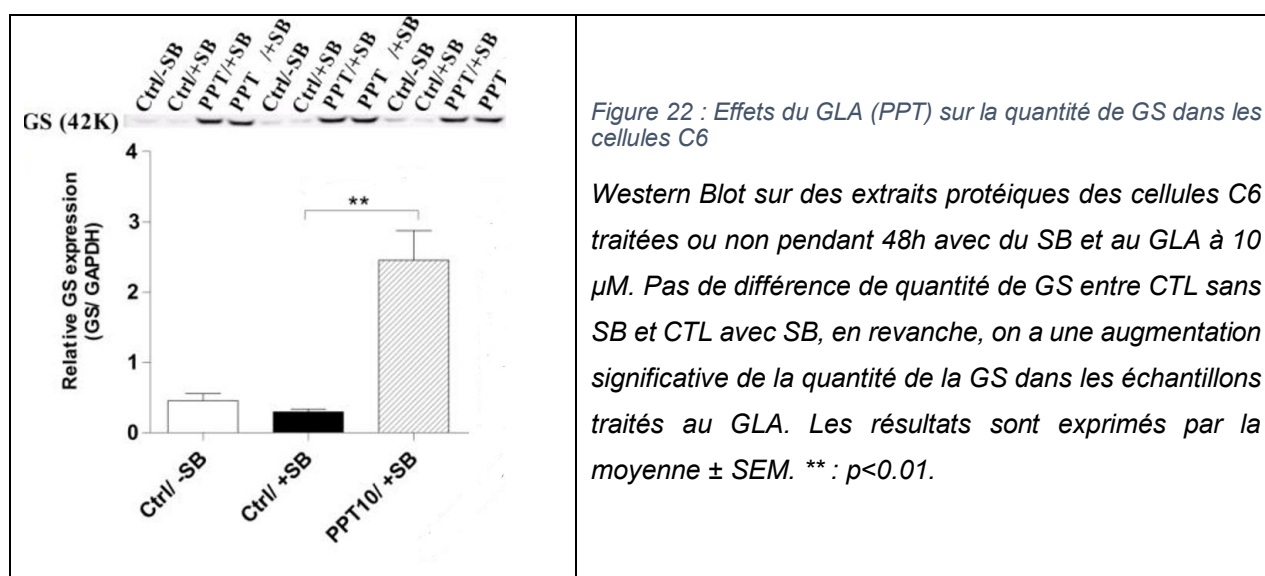


Figure 21 : Effets du GLA sur la croissance des cellules C6

La croissance cellulaire a été mesurée à partir de cultures cellulaires (50.10^3 cellule/ml à J0) par comptage cellulaire après coloration des noyaux au DAPI après 2 jours, 5 jours et 8 jours. Différentes concentrations de GLA ont été ajoutées dans les milieux de cultures à J0 (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M et 100 μ M). Les résultats montrent un effets dose du GLA avec une baisse de la prolifération cellulaire et un détachement de la courbe de croissance dès 3 μ M. Les résultats sont exprimés par la moyenne $\pm$ SEM. **: $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$.

e) Analyse semi-quantitative de la glutamine synthétase (GS)

Le glutamate est transformé en glutamine par la GS. Le GLA étant capable d'inhiber la GS *in vitro* (Lapouble et al., 2002), les taux de protéine GS ont été analysés par WB. Des études antérieures ont indiqué qu'un traitement avec le sodium butyrate (SB) pendant 24 heures peut induire une augmentation de l'activité la GS qui pourraient indiquer que les cellules sont en cours de différenciation (Sun et al., 1997). Dans notre étude, le traitement avec le SB a duré 48 heures pour s'assurer que l'étape de la différenciation des cellules se rapproche à son stade final. Aucune différence significative des niveaux de quantité de la GS n'est détectée entre les deux contrôles (avec et sans SB), mais une augmentation significative des niveaux de la GS a été mesurée dans les échantillons traités au GLA (8,38 fois par rapport aux CTL+SB) indiquant que cela est purement l'effet du pesticide et n'est pas une conséquence de la différenciation induite par SB (figure 22). L'augmentation de la quantité de la GS dans les cellules traitées au GLA peut être due à une conséquence de l'inhibition de l'activité de cette enzyme car les résultats préliminaires obtenus sur l'activité de la GS ne montrent aucune différence.

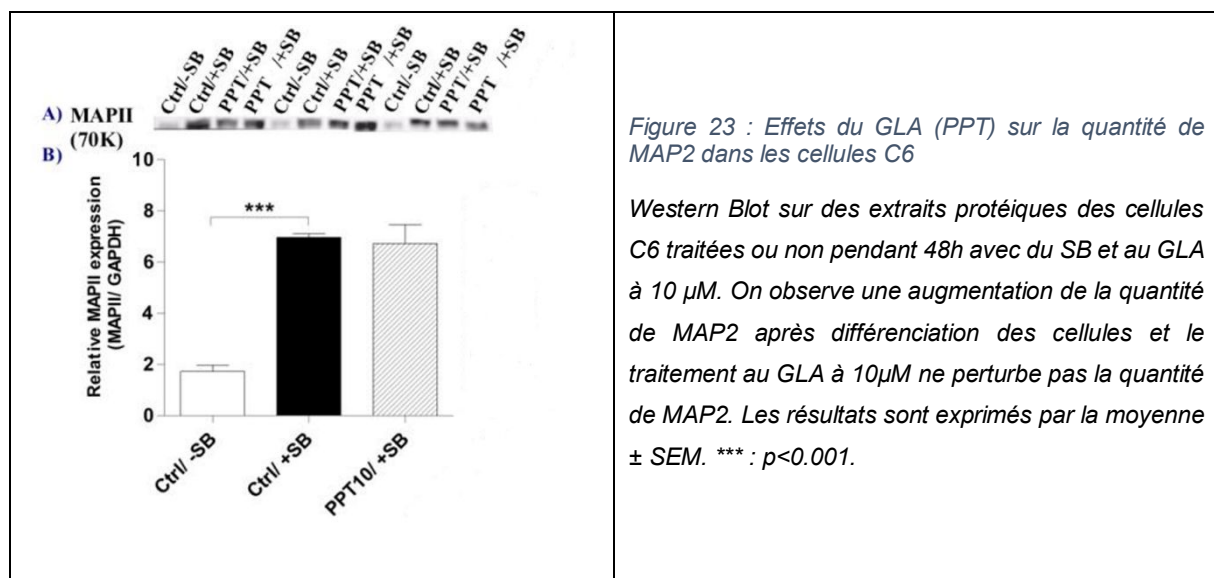


f) Analyse semi-quantitative des protéines impliquées dans le cytosquelette

Plusieurs protéines pouvant avoir un rôle important dans l'organisation du cytosquelette ont été ciblées et leur quantité relative a été mesurée dans des extraits protéiques cellulaires C6.

Les microtubules-associated proteins-II (MAP2) sont des protéines du cytosquelette spécifiques des neurones, localisées plus particulièrement dans les dendrites qui jouent un rôle dans la détermination et la stabilisation de la forme dendritique des neurones au cours du développement (Malafronte et al., 2014).

Comme attendu, le niveau de MAP2 est 5,66 fois plus élevé dans les cellules CTL différenciées par rapport aux CTL non différenciées à cause de son activité de stabilisation des microtubules (figure 23). En revanche, on n'observe aucune différence dans la quantité de MAP2 dans les cellules exposées au glufosinate d'ammonium ce qui suggère que le traitement avec le pesticide ne perturbe pas la fonction et la régulation de MAP2.



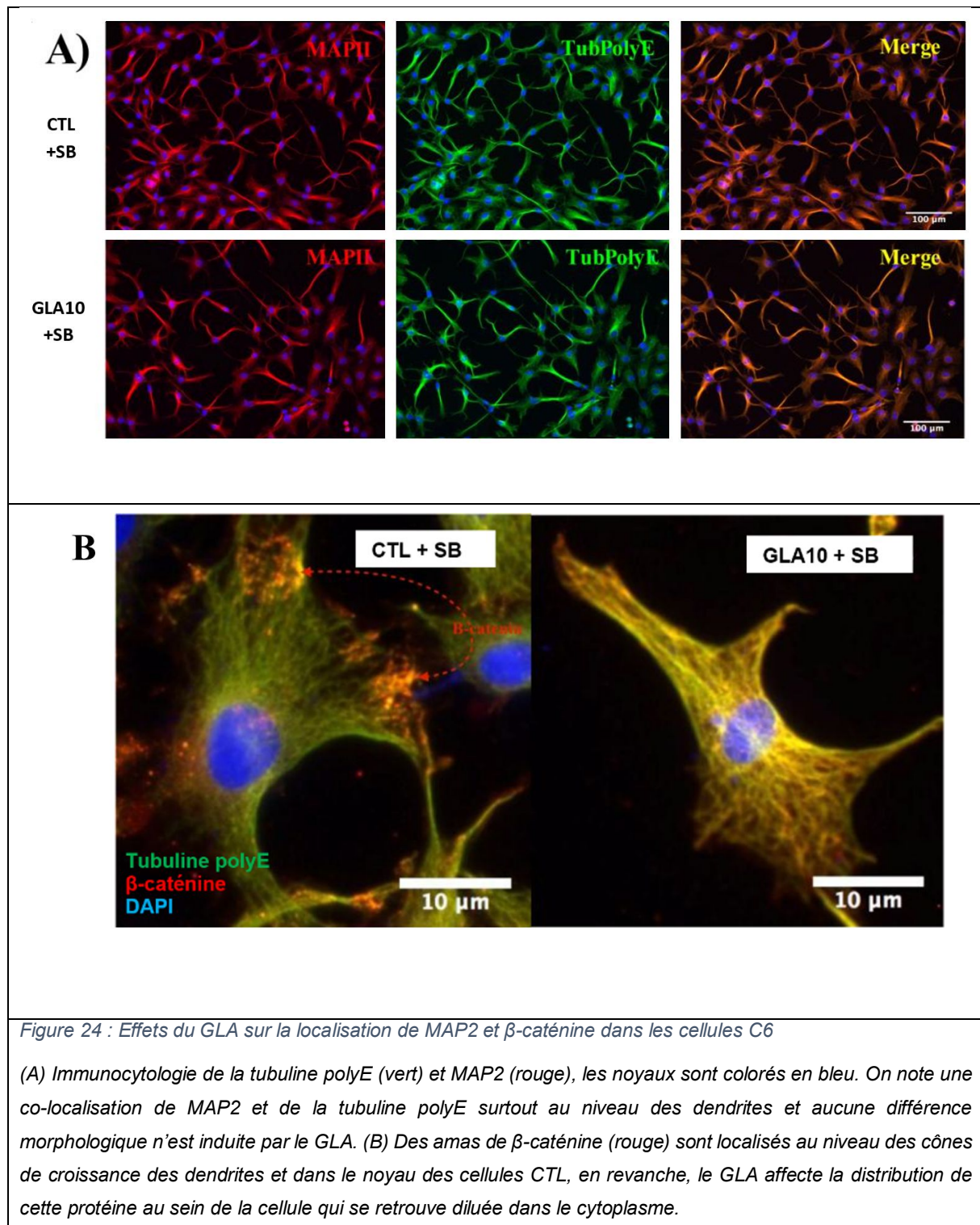
L'analyse semi-quantitative d'autres protéines jouant un rôle important dans la forme, la motilité et l'adhésion cellulaires, n'a mis en évidence aucune perturbation induite par l'exposition au GLA à 10 µM dans les cellules différenciées avec le SB. Le tableau 8 résume les taux protéiques de différentes protéines impliquées dans la polyglutamylation (TTLL1 et TTLL5), l'enzyme qui fait la réaction inverse de la glutamine synthétase (la Glutaminase ou GLS), et deux protéines du cytosquelette (MARKS et β -caténine).

Tableau 7 : Les taux protéiques de différents acteurs du cytosquelette

	CTL non différenciées	CTL différenciées	GLA 10 μ M
GLS	0.70 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.39	0.72 $\pm$ 0.13
TTLL1	2.03 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.003
TTLL5	0.46 $\pm$ 0.013	0.16 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.03
MARKS	2.85 $\pm$ 0.84	2.78 $\pm$ 0.38	3.94 $\pm$ 0.95
β -caténine	60.84 $\pm$ 6.88	63.52 $\pm$ 7.03	82.22 $\pm$ 7.00

Puisque la polyglutamylation de la tubuline est fortement impliquée dans les interactions du cytosquelette avec les autres partenaires comme les protéines MAP2, une perturbation de la polyglutamylation peut altérer, non pas la quantité, mais la localisation de ces protéines. Le marquage immunocytologique et les techniques de microscopie à fluorescence ont été utilisés pour étudier la distribution subcellulaire de la polyE, la MAP2 et la β -caténine dans les cellules différenciées en présence ou non du pesticide. Les pseudos dendrites formées après différenciation des cellules sont fortement polyglutamylées et la protéine MAP2 est fortement présente aussi. On a donc une parfaite co-localisation (figure 24a). L'ajout du GLA dans le milieu de culture n'a pas altéré sa localisation dans la cellule.

La β -caténine est exprimée essentiellement dans le cône de croissance où elle est impliquée dans l'adhésion cellulaire et au niveau nucléaire où elle joue un rôle de co-activateur transcriptionnel (Huber and Weis, 2001; Jamieson et al., 2012). Le marquage par immunofluorescence nous a permis de mettre en évidence une dérégulation de la localisation de la β -caténine dans les cellules exposées au pesticide. En effet, la β -caténine forme des amas protéiques au niveau des cônes de croissance des cellules et au niveau nucléaire, mais le signal de la β -caténine est très diffus, localisé différemment des CTL dans les cellules traitées au GLA (figure 24b).



4) Discussion

Pour comprendre les effets du GLA sur un aspect fondamental qui est la polyglutamylation de la tubuline, notre choix de modèle s'est porté sur la lignée cellulaire C6 (lignée cellulaire de glioblastome de rat) car ces dernières ont un fort pouvoir prolifératif. Elles peuvent se répliquer indéfiniment (auto-renouvellement), et se différencier en neurone-like après induction et présentent des prolongements fortement polyglutamylés. Les cellules C6 semblent donc un modèle qui convient pour étudier les potentiels effets du GLA sur la polyE du cytosquelette et ses conséquences sur la prolifération et la différenciation de ces dernières.

La migration cellulaire est déclenchée principalement par un certain nombre de signaux. Lors de leur liaison à des récepteurs de surface cellulaire, ces signaux stimulent des voies de signalisation intracellulaire qui régulent la réorganisation du cytosquelette. Plusieurs protéines importantes intervenant dans les voies de signalisation ont été identifiées comme étant surexprimées dans plusieurs types de cancers (Tejada-Simon, 2015). Les microtubules sont des protéines du cytosquelette multifonctionnelles impliquées dans de nombreux rôles cellulaires essentiels, y compris le transport intracellulaire, la mitose et dans la formation de fuseau mitotique afin d'assurer à la fois la ségrégation correcte des chromosomes et la division cellulaire.

Des études précédentes ont démontré que le GLA inhibe *in vitro* l'activité de la glutamine synthétase (Lapouble et al., 2002). Nos résultats montrent une augmentation de la quantité de GS détectée par western blot dans les cellules traitées au GLA. Cette augmentation semblerait être un moyen de compensation pour palier la baisse de l'activité de la GS. La GS ne semble pas être la seule cible du GLA, nous avons cherché d'autres systèmes impliquant le glutamate. Toutefois, la similarité structurale avec le glutamate implique que le système de polyglutamylation (PolyE) est une cible potentielle pour le pesticide.

La polyglutamylation est une modification de la tubuline post-traductionnelle commune dans les neurones et les cellules ciliées ou flagellées. La longueur des chaînes de glutamate sur les microtubules est essentielle pour réguler la liaison des protéines associées aux microtubules (MAP) (Janke et al., 2008). Cette modification

de la tubuline se produit également au cours de la prolifération des cellules où elle est associée à des centrioles et du fuseau mitotique.

Fait intéressant, l'activité de la tubuline polyglutamylase dépend du cycle cellulaire (pics d'activité en phase G2 du cycle cellulaire), tandis que les niveaux les plus élevés de la polyE de la tubuline se trouvent pendant la mitose (Regnard et al., 1999). Dans les cellules en mitose, l'activité de la tubuline polyglutamylase est faible alors que le niveau de glutamylation est toujours élevé. Enfin, l'activité de polyglutamylase de la tubuline et le niveau de la tubuline polyE semblaient être en relation inverse. Ce paradoxe suggère une régulation complexe des polyglutamylases et l'activité des déglutamylases.

La stabilité des microtubules et du centriole est due à une forte polyglutamylation qui leur confère une stabilité à long terme. Elle est impliquée aussi dans le contrôle de l'association des MAP centrosomales spécifiques à la paroi centriole (Bobinnec, 1998a). Brants *et al* ont montré que la surexpression de l'enzyme tubuline tyrosine ligase-like 12 (TTLL 12) (une des enzymes responsable de la polyE) peut retarder la progression du cycle cellulaire de phase G2 / M et de G1. C'est une évidence que la polyglutamylation est nécessaire pour la liaison des dynéines aux microtubules (Brants et al., 2012). Ces résultats sont en cohérence avec nos données de prolifération, le GLA semble donc bloqué la croissance cellulaire, entre autre, *via* les phénomènes de polyglutamylation.

En ce qui concerne nos données, il est possible que l'exposition *in vitro* au GLA puisse avoir un impact sur le comportement des cellules par des modifications de polyglutamylation. Nous avons montré une diminution de la prolifération des cellules sans avoir d'effet cytotoxique ni sur la viabilité cellulaire. En parallèle, des marquages immunocytologiques ont été réalisés sur ces cellules après l'induction de la différenciation par le sodium butyrate. Le GLA induit une altération de la tubuline polyE périphérique responsable dans la stabilisation des pseudo-dendrites qui se forment lors de la différenciation.

Les effets du GLA à faibles doses pendant la période périnatale sont très néfastes sur la stabilité et le bon fonctionnement du cytosquelette surtout au niveau de la polyglutamylation, ayant des conséquences sur la migration et la prolifération des cellules notamment au niveau de la neurogenèse bulbaire. A ce stade, nous nous

sommes interrogés sur les conséquences de ces modifications cellulaires et moléculaires induites par une exposition périnatale sur le comportement.

*Le Glufosinate d'ammonium et les
conséquences comportementales*

Le Glufosinate d'ammonium et les conséquences comportementales

1) Introduction

L'exposition des souris en périnatal au GLA à faibles doses (0.2 et 1 mg/kg/3 fois par semaine) a des effets délétères sur le neurodéveloppement indésirables. L'exposition précoce peut affaiblir la structure de base du développement du cerveau et provoquer des changements permanents menant à un large éventail d'effets à long terme sur la santé ainsi que sur le comportement. Dans cette étude, nous avons démontré que cette exposition provoque des altérations neuroanatomiques et des problèmes de migration des neuroblastes de la SVZ vers les BO. Ici, nous avons, en collaboration avec Anthony *Laugeray*, étudié les impacts développementaux et comportementaux potentiels du GLA sur la progéniture pendant les premiers jours après leur naissance et à l'âge adulte. Dès la naissance, les souriceaux sont soumis à une batterie de tests neurocomportementaux visant à étudier leur développement sensori-moteur. Des mesures des vocalisations ultrasoniques, des réflexes de redressement, de la marche, de la géotaxie, et de l'escalade verticale sont réalisées du PND1 à PND14. A l'âge adulte, les souris sont soumises à des tests comportementaux pour évaluer leur réactivité émotionnelle par le test de la croix surélevée et leur mémoire émotionnelle dans le test de sociabilité à trois chambres. Les souris sont mises en interaction directe avec d'autres congénères et dans le test d'habituation/déshabitude olfactive pour évaluer leur sociabilité et leur préférence pour les indices sociaux olfactifs.

Les résultats obtenus montrent des effets significatifs et délétères de l'exposition maternelle au GLA sur le développement des premiers réflexes sensori-moteurs, de la vocalisation ultrasonique dans les premiers jours de développement et des altérations des comportements affiliatifs et olfactifs à l'âge adulte. La réactivité émotionnelle et la mémoire émotionnelle sont restées inchangées. Ces altérations comportementales ont montré une ressemblance avec les altérations comportementales observées dans des modèles animaux des troubles du spectre autistique.

L'intégralité de ces résultats ont fait objet d'une publication dans *Frontiers in Behavioral Neuroscience* en 2014, et sont présentés ci-dessous.

2) Article: Pre- and postnatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice.

Anthony Laugeray¹, **Ameziane Herzine**¹, Olivier Perche^{1,2}, Betty Hébert¹, Marine Aguilon-Naury³, Olivier Richard^{1,3}, Arnaud Menuet^{1,3}, Séverine Mazaud-Guittot⁴, Laurianne Lesné⁴, Sylvain Briault^{1,2}, Bernard Jegou⁴, Jacques Pichon^{1,3}, Céline Montécot-Dubourg^{1,3} and Stéphane Mortaud^{1,3}.

¹ Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires – UMR7355 CNRS – 3b, Orléans, France

² Département de génétique, Centre Hospitalier Régional, Orléans, France

³ Université d'Orléans, Orléans, France

⁴ IRSET INSERM U 1085, Université de Rennes I, Rennes, France



Pre- and postnatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice

Anthony Laugeray^{1*}, Ameziane Herzine¹, Olivier Perche^{1,2}, Betty Hébert¹, Marine Aguilon-Nauray³, Olivier Richard^{1,3}, Arnaud Menuet^{1,3}, Séverine Mazaud-Guittot⁴, Laurianne Lesné⁴, Sylvain Briault^{1,2}, Bernard Jegou⁴, Jacques Pichon^{1,3}, Céline Montécot-Dubourg^{1,3} and Stéphane Mortaud^{1,3}

¹ Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires – UMR7355 CNRS – 3b, Orléans, France

² Département de génétique, Centre Hospitalier Régional, Orléans, France

³ Université d'Orléans, Orléans, France

⁴ IRSET INSERM U 1085, Université de Rennes I, Rennes, France

Edited by:

Francesca Cirulli, Istituto Superiore di Sanità, Italy

Reviewed by:

Gregg Stanwood, Vanderbilt University, USA

Xiaoming Wang, Duke University, USA

*Correspondence:

Anthony Laugeray, INEM
INSERM – UMR7355 CNRS – 3b, rue
de la Férollerie, Orléans 45071,
France
e-mail: alaugeray@yahoo.fr

Glufosinate ammonium (GLA) is one of the most widely used herbicides in agriculture. As is the case for most pesticides, potential adverse effects of GLA have not been studied from the perspective of developmental neurotoxicity. Early pesticides exposure may weaken the basic structure of the developing brain and cause permanent changes leading to a wide range of lifelong effects on health and/or behavior. Here, we addressed the developmental impact of GLA by exposing female mice to low dose GLA during both pre- and postnatal periods and analyzed potential developmental and behavioral changes of the offspring during infancy and adulthood. A neurobehavioral test battery revealed significant effects of GLA maternal exposure on early reflex development, pup communication, affiliative behaviors, and preference for social olfactory cues, but emotional reactivity and emotional memory remained unaltered. These behavioral alterations showed a striking resemblance to changes seen in animal models of Autistic Spectrum Disorders. At the brain level, GLA maternal exposure caused some increase in relative brain weight of the offspring. In addition, reduced expression of *Pten* and *Peg3* – two genes implicated in autism-like deficits – was observed in the brain of GLA-exposed pups at postnatal day 15. Our work thus provides new data on the link between pre- and postnatal exposure to the herbicide GLA and the onset of autism-like symptoms later in life. It also raises fundamental concerns about the ability of current safety testing to assess risks of pesticide exposure during critical developmental periods.

Keywords: glufosinate ammonium, autistic spectrum disorders, pre- and postnatal exposure, neurodevelopment, mice

INTRODUCTION

Harmful effects of exposure to pesticides during critical developmental stages are becoming increasingly evident, and consequently, may significantly contribute to the rise in chronic diseases later in life such as cancer, infertility, diabetes, cardiovascular diseases, and obesity, but also in psychiatric disorders including schizophrenia, mood disorders, and autism spectrum disorders (Barouki et al., 2012). There is a growing interest in the range of alterations, which pre- and postnatal exposure to pesticides may produce on behavioral, emotional, and cognitive skills (Julvez and Grandjean, 2009). Previous studies reported that prenatal urinary measures of pesticides exposures were associated with increased abnormal reflexes in human neonates living in an agricultural

community (Young et al., 2005). In line with this, prenatal exposure to some pesticides was associated with both psychomotor and mental developmental delays in young children (Rauh et al., 2006). Further, prenatal pesticide exposure has been associated with Autistic Spectrum Disorders (ASD) (Eskenazi et al., 2007).

Organophosphorus pesticides (i.e., compounds containing carbon–phosphorus bonds) are the most widely used pesticides in the world and comprise nearly 40 different chemical substances registered by the US Environmental Protection Agency (EPA) (www.epa.gov). According to the latest US EPA survey, glyphosate, a well-known compound in the organophosphorus family, was the most used herbicide in 2007 (EPA, 2011). As glyphosate-resistant weeds have begun to develop around the world (Cerdeira and Duke, 2006), herbicides containing glufosinate ammonium (GLA, another organophosphorus compound) will probably soon become the best alternative for treating glyphosate-resistant crops, and will therefore be used massively for years. To cope with this, many crop varieties have been genetically engineered to be GLA-tolerant (Ay et al., 2012). Accurate assessments of the adverse effects of GLA must therefore be conducted, in particular during the highly sensitive early stages of the life cycle.

Abbreviations: ASD, autistic spectrum disorders; *Chd8*, chromodomain helicase DNA-binding-8; CNS, central nervous system; DCX, doublecortin; EPA, environmental protection agency; EPM, elevated plus maze; GLA, glufosinate ammonium; GLA0.2, glufosinate ammonium 0.2 mg/kg; GLA1, glufosinate ammonium 1 mg/kg; mRNA, messenger ribonucleic acid; *Peg3*, paternally expressed gene 3; PND, postnatal day; *Pten*, phosphatase and tensin homolog; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; USVs, ultrasonic vocalizations.

Glufosinate ammonium is the ammonium salt of phosphinothricin [D,L-homoalanin-4-(methyl) phosphinate], a structural analog of glutamate. GLA acts as a competitive and irreversible inhibitor of glutamine synthetase, a vital enzyme in plants, needed to fix nitrogen to organic molecules of ammonium ions. However, glutamine synthetase is also present in the mammalian central nervous system (CNS). In astroglial cells, glutamine synthetase plays an essential role in the homeostasis of glutamate, a major neurotransmitter in the CNS (Bak et al., 2006). In acute conditions, GLA has neurotoxic effects, as evidenced by neurological symptoms (seizures and memory loss) displayed by humans attempting suicide by ingesting large quantities of GLA-containing herbicide (Park et al., 2006). In animal models, GLA has been shown to induce seizures in mice (Lapouble et al., 2002). Additionally, it has been shown that GLA-induced embryo lethality, major morphological head defects (Watanabe and Iwase, 1996), and neuroepithelium apoptosis (Watanabe, 1997) in developing mouse embryos in culture. Direct exposure of the rat brain to acute doses of GLA causes alterations to glutamate neurotransmission (Nakaki et al., 2000). We recently showed that chronic administration of a moderate dose of GLA induced memory impairments, brain structural modifications, astrogliosis, and disturbances of the glutamate homeostasis in adult mice (Calas et al., 2008; Meme et al., 2009).

While the neurotoxic effects of acute doses of GLA in adult humans are well documented, little is known about the chronic effects of low doses of GLA during neurodevelopmental stages. It is essential to characterize the harmful long-term effects, which may interfere with brain development and lead to permanent abnormalities. Here, we developed an experimental murine model of chronic pre- and postnatal exposure to low dose GLA and examined the down-stream effects, at the behavioral and molecular levels in pups and adult mice. Ontogenetic endpoints typical of infancy such as ultrasonic calls and early reflex development were assessed early after birth. We further investigated the long-term effects on a number of behavioral dimensions during adulthood. We explored gene expression in the brain to establish whether such changes could be related to GLA-induced behavioral abnormalities. We chose to administer GLA intranasally as very few studies are exploring the effects of aerosol exposure to pesticides despite accumulating evidence that air is particularly relevant to agricultural communities that are highly exposed to pesticides by air contamination (Fenske et al., 2002a,b). Urban people may also be concerned by such a pollution as non-dietary exposure to pesticides occurs mostly in the home (Simcox et al., 1995), as evidenced by studies on urban settings highlighting the widespread use of pesticides indoors (Whyatt et al., 2002; Berkowitz et al., 2003).

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS AND TREATMENTS

Seven-week-old female C57Bl6 mice were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France). All mice were bred and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.) with food and water *ad libitum* in a temperature controlled ($21 \pm 1^\circ$) room in the animal resource facility (UPS44, CNRS Orléans – France). After an acclimation period of 2 weeks, two female mice were paired with one male C57Bl6 mouse also from Janvier (Le Genest St Isle, France), in standard

laboratory cages (42 cm $\times$ 28 cm $\times$ 18 cm) to mate. Pregnant mice were then isolated and divided into three experimental groups treated intranasally with GLA (1 or 0.2 mg/kg; PESTANAL®, analytical standard from Sigma–Aldrich) (GLA1 and GLA0.2) and the control group (CTL) with saline solution (NaCl 0.9%). Intranasal exposure was performed by administration of 10 μ L of solution for a 30 g mouse deposited at the entrance to the nostrils. Dams were treated three times a week, from gestational day (GD) 10 to postnatal day 15 (PND 15). Control animals received a comparable dose of 0.9% saline. Offspring were weaned at 21 days of age and maintained in same-sex, litter-mate housed cages with *ad libitum* access to food and water. All aspects of animal care and experimentation were in accordance with the European Parliament and Council Directive (2010/63/EU). The Ethics Committee approved all animal care and use for this study (Approval C45-234-6).

GENERAL PROCEDURE

The general procedure is shown in **Figure 1A**. Mating was performed within 5–6 days. At the end of this period, males were removed and dams were weighed every 2 days. Females having gained 2 g were considered pregnant and were then isolated in standard cages including nesting material (pressed cotton). Intranasal treatment began the same day and lasted until PND 15. Each female received 10 treatments (4 during pregnancy and 6 during lactation) three times a week (on Monday, Wednesday, and Friday; between 9:00 and 12:00 a.m.). By using such a protocol, we could notice that about 10 ± 1 day separated the first exposure from delivery. Thus, we could estimate the exposure to begin between GD 9–11 for all the litters. In order to verify that intranasal exposure to GLA did not induce olfactory deficits in dams (which could be responsible for abnormal maternal behavior), we exposed another group of non-pregnant C57Bl6 females to a similar protocol of administration (10 intranasal treatments with CTL, GLA0.2, and GLA1 solutions) and tested their olfactory abilities in the habituation/dishabituation olfactory test (see below for detailed procedure).

As previously stated, females were weighed every 2 days during pregnancy (before each treatment) in order to evaluate GLA toxicity during gestation. Two to three days before delivery, we assessed females' nesting abilities to check whether GLA-induced behavioral deficits. At birth, the mean number of pups by litter was determined. One day after birth, all pups irrespective of their sex, were weighed and then tested in a series of preweaning tests to check the effects of pre- and postnatal exposure to GLA on postnatal development. As GLA is not known to have sex-specific effects, we chose to not differentiate male from female siblings for early postnatal analyses. Indeed, our goal was rather to detect gross developmental alterations. The set of analyses performed is recapitulated in **Table 1**. On a first cohort, we investigated pups communication by monitoring of ultrasonic vocalizations (USVs) from PND 1 to 5. Immediately after the 3-min period of USV collecting, we assessed early sensory and motor development by monitoring seven parameters in all pups: the righting reflex (from PND 1 to 10), walking and 45° negative geotaxia (from PND 5 to 10), vertical climbing and bar grasping (from PND 9 to 14), and the day of eyelid opening and acquisition of the acoustic startle reflex (from PND 11 to 14). Duration of this testing period was no more than 5 min by pup. Data from each pup of all litters ($n = 8$

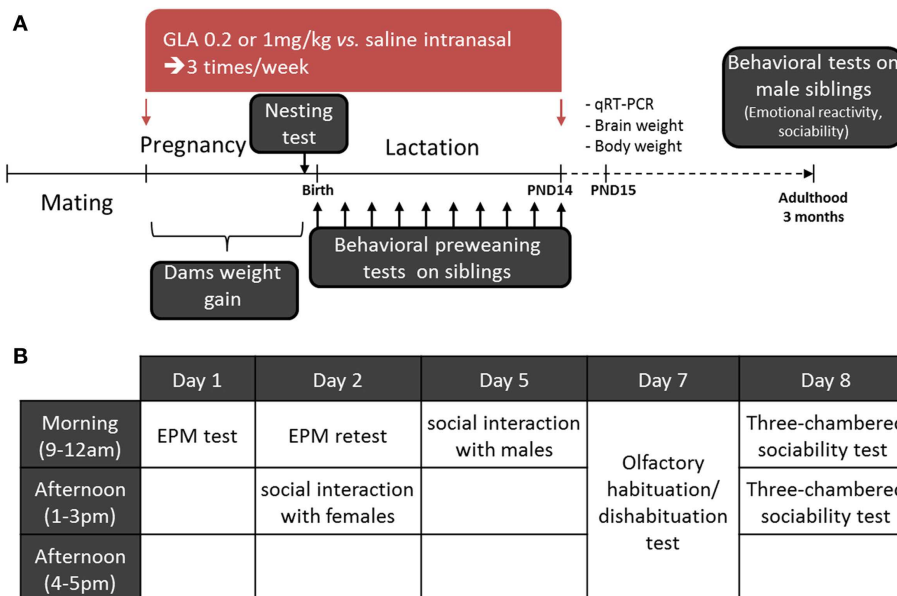


FIGURE 1 | Experimental design of the study. (A) On arrival, female mice were kept undisturbed in the laboratory for 2 weeks before beginning the experiment. They were then paired with male mice for 5–6 days to mate. Pregnant mice were treated intranasally with either GLA (0.2 or 1 mg/kg) or saline solution. Dams were treated three times a week until postnatal day 14 (PND 14). During pregnancy, female mice were weighed and their ability to build a nest tested 2–3 days before delivery. Prewearing tests were performed on all siblings from birth to

PND 14. Males only were then left undisturbed until adulthood (3 months). A second cohort was left reaching PND 15 and was then euthanized to perform whole brain qRT-PCR and body/brain weight analyses. **(B)** At adulthood, the male mice were tested as follows: on day 1, the elevated plus maze (EPM); day 2, EPM retest and social interaction with females; day 5, social interaction with males; day 7, the olfactory habituation/dishabituation test; and day 8, the three-chambered sociability test.

litters for CTL and $n = 6$ litters for GLA0.2 and GLA1) was collected and then averaged so as to the litter was used as the unit for statistical analyses. At weaning time (PND 21), only male offspring were reared by litter and left undisturbed until the age of 3 months to conduct adult behavioral analyses. For adult testing, groups' composition was as follow: $n = 28$ (from eight litters) for the CTL group, $n = 19$ (from six litters) for the GLA0.2 group, and $n = 11$ (from four litters). We chose to focus on male offspring in order to avoid hormonal fluctuations occurring during the estrous cycle, which could affect animal behavior and thus complicate data interpretation. Male offspring were tested in the elevated plus maze (EPM) to assess emotional reactivity, in the 24-h EPM retest to assess emotional memory, in the three-chambered sociability and social interaction test (vs. female and vs. male) to assess sociability, and in the olfactory habituation/dishabituation test to assess their preference for social olfactory cues. All the tests were performed as shown in **Figure 1B**. Another set of pups pre- and postnatally exposed to CTL, GLA0.2, or GLA1 solutions were allowed to reach PND 15 in order to perform physical analyses (brain and body weight) and gene expression analyses by qRT-PCR from whole brain tissues. For these analyses, only male pups were used.

OLFACTORY ABILITIES OF FEMALE MICE INTRANASALLY EXPOSED TO CTL/GLA SOLUTIONS

Non-pregnant C57Bl6 females were exposed three times a week to intranasal treatments with CTL ($n = 8$), GLA0.2 ($n = 8$), and

GLA1 solutions ($n = 8$) during a time period corresponding to the treatment period of dams in the pre- and postnatal exposure protocol (10 treatments). Their olfactory abilities were then tested in the habituation/dishabituation olfactory test (see experimental procedure described below) 24 h after the last treatment.

NEUROBEHAVIORAL ASSESSMENT: PREWEANING TESTS

Ultrasound vocalizations

Vocalizations were recorded (from PND 1 to 5; each animal was tested on each of these days) during a 3-min period using the following experimental setup: a custom designed recording chamber made of transparent Plexiglas, four ultrasound detectors (UltraVox 4-channel system; Noldus Information Technology), and data acquisition software (UltraVox 2.0; Noldus Information Technology), which automatically monitored the occurrence of vocalizations within user-defined frequencies (in our case: 20, 40, 60, and 80 KHz). The number of USVs was recorded on a personal computer for offline analysis and storage. The computerized recording system was set to eliminate non-relevant sounds (background noise) and to ignore ultrasounds outside the defined frequency range. Ultrasonic calls were recorded for 3-min periods, between 9:00 and 12:00 a.m., in an experimental room maintained at approximately 21°C. A single pup was removed from the litter and placed in a square container (5 cm × 5 cm; height, 2 cm) at the center of a sound-attenuating chamber, and USVs were assessed. All the pups were individually tested in turn. The container had been saturated with maternal odor to avoid

Table 1 | Analyses performed on control and glufosinate exposed offspring.

	PND 1	PND 2	PND 3	PND 4	PND 5	PND 6	PND 7	PND 8	PND 9	PND 10	PND 11	PND 12	PND 13	PND 14	PND 15	Adulthood
Behavioral analyses																
(Cohort 1)																
Ultrasonic vocalizations	*	*	*	*	*											
Righting reflex	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
Walking					*	*	*	*	*	*						
45° Negative geotaxia					*	*	*	*	*	*						
Vertical climbing									*	*	*	*	*	*		
Bar grasping									*	*	*	*	*	*		
Eyelid opening											*	*	*	*		
Acoustic startle reflex											*	*	*	*		
Elevated plus maze test															*	*
Three-chambered sociability test															*	*
Interaction test vs. female															*	*
Interaction test vs. male															*	*
Habituation/dishabituation olfactory test															*	*
Molecular analyses																
(Cohort 2)																
Whole brain qRT-PCR															*	
Physical analyses																
(Cohort 1, 2)																
Body weight	*														*	
Brain weight															*	

On a first cohort, pups communication was investigated by monitoring of ultrasonic vocalizations (USVs) from PND 1 to 5. Immediately after, early sensory and motor development was assessed by monitoring seven parameters in all pups. At weaning time (PND 21), male offspring were tested in the elevated plus maze (EPM) to assess emotional reactivity, in the 24-h EPM retest to assess emotional memory, in the three-chambered sociability and social interaction test (vs. female and vs. male) to assess sociability, and in the olfactory habituation/dishabituation test to assess their preference for social olfactory cues. Another set of pups pre- and postnatally exposed to CTL, GLA0.2, or GLA1 solutions were allowed to reach PND 15 in order to perform physical analyses (brain and body weight) and gene expression analyses by qRT-PCR from whole brain tissues.

environmental stress and had been cleaned between runs. After the 3-min recording session, each pup went through all the other preweaning tests. For each pup, we measured the cumulative number of calls emitted during the 5 days (i.e., total number of calls from PND 1 to 5). The litter was used as the unit for statistical analyses.

Postnatal sensory and motor development

The investigation of early postnatal sensory and motor development monitored seven parameters:

- *Negative geotaxia*: The pup turned upwards when placed on a 45° angle slope with its head pointing down the incline (PND 5–10). We recorded the age when pups acquired the reflex.
- *Adult walking pattern*: During the first days of the pup's life, the steps produce a pivoting walk, later developing into linear displacement. We recorded the age when linear displacement replaced pivoting (PND 5–10).
- *Righting reflex*: When a pup is placed on its back on a flat, hard surface, it has to right itself on all four paws, with two successes in three trials getting a score of 1. A failure is recorded when the pup remains on its back for more than 10 s, and a score of 0 is given. The age when pups got two successes in three trials was recorded (from PND 1 to 10).
- *Vertical climbing*: The pup is held against a vertical metallic grid (mesh: 6 mm wide). Climbing was scored when the pup passed out five stitches (PND 9–14). The day of success was recorded.
- *Bar Holding*: The forepaws are placed on a round wooden bar (7 mm diameter). The ability to hang for 10 s using the forepaws was scored (PND 9–14). The day of success was collected.
- *Eyelid opening*: Defined as any visible break in the membrane covering the eye. We examined pups from PND 11 to 14 and determined the day of eyelid opening (pups with at least one eyelid opened).
- *Acoustic startle reflex*: From PND 11 to 14, a small hand-held clicker generated a loud noise and the jerk behavior immediately following was scored. The day of reflex acquisition was noted.

For all these tests, each pup was tested and their scores averaged per litter so as to the litter was used as the unit for statistical analyses.

ADULT BEHAVIOR

Three-chambered sociability test

Mice were run individually in a three-chambered arena made of clear polycarbonate. Retractable doorways built into the two dividing walls controlled access to the side chambers. Each of the two outside chambers had an inverted empty wire cup, one side housing a male CBA/J stimulus mouse age-matched to the test mouse, and the other side with a plastic object (plastic mouse). The test session began with a 5-min habituation session for the entire apparatus with the mouse free to explore the entire arena. The subject was then briefly confined to the center chamber while the plastic object was placed in the cup on one side and an adult male CBA/J mouse was placed in the cup on the other side. The object/novel mouse sides were alternated left and right between subjects. Once the stimuli were in position, the two side doors were simultaneously raised and the subject could access all three

chambers for 5 min. Automatic monitoring recorded and scored the time spent in contact with each wire cup using the Etho-Vision video-tracking system (Noldus, The Netherlands). The apparatus was cleaned between subjects using a 70% ethanol/water solution.

Social interaction

Social interaction was tested in a novel cage (24 cm × 11 cm × 12 cm) with clean sawdust. Each mouse was paired with an unfamiliar NMRI female on day 1 and with an unfamiliar CBA/J male mouse on day 2. Opponent mice were age-matched to the test mouse. The test mouse was isolated for 30 min before the unfamiliar conspecific was placed in the cage. Social interaction between the two was recorded using a digital camera mounted above the cage at ceiling level. The paired mice had never interacted before. The videos were analyzed by an independent observer blind to the study protocol. Social investigation was scored according to the following behavioral parameters:

- head, body, and anogenital sniffing: sniffing of the conspecific by the test mouse
- walkover: the test mouse places its forepaws on the head or back of the conspecific
- following: the test mouse follows the conspecific directly behind it.
- mounting
- allogrooming: the test mouse grooms the conspecific
- aggression.

The duration of the social interaction was calculated as the total time spent by the test mouse carrying out all or any of the above-mentioned behaviors.

Habituation/dishabituation olfactory test

The test was an adapted version of Yang and Crawley (2009). Each subject mouse was tested in a clean arena with a thin layer of fresh bedding. Cotton swab material was used as the medium for each odor stimulus and was inserted in a small plastic tube (Eppendorf; 1 mL) cut open at the bottom (see Video 1 in Supplementary Material). To reduce novelty-induced exploratory activities, a 30 min period was set aside before testing for each subject to become habituated to the testing cage, which contained a clean dry cotton swab.

Testing consisted in a sequence of 15 × 2-min exposures to odors presented in the following order: 3 plain tap water, 3 almond, 3 banana, 3 social odor 1, and 3 urine/social odor 2. The almond and banana odors were made with food flavoring (Selectarôme, Cannes La Bocca, France). All non-social odors were made by dipping the cotton into the solution for 1 s. Social odors were made by mixing urine from a number of C57Bl6 adult male mice. Each subject was exposed to two novel social odors made from two different sources. Time spent sniffing the tube was measured using the EthoVision video-tracking system (Noldus, The Netherlands). Sniffing was scored when the distance between the nose and the tube was 1.5 cm or less. Each inter-session interval was approximately 1 min.

Elevated plus maze

The EPM was used as it is known to detect anxiety-like behavior in rodents (Pellow et al., 1985; Yee et al., 2007). The apparatus had a central hub (5 cm × 5 cm), and two pairs of diametrically opposed arms, one pair open with no sides (27 cm × 5 cm) and the other pair fully enclosed (27 cm × 5 cm × 15 cm). The maze was made of black Plexiglas, elevated to a height of 60 cm and the open arms were lit by bulbs providing 35 lux at the far end of each. The 5-min test began by placing an individual mouse at the end of an enclosed arm. A video camera mounted above the maze recorded the trials for later analysis. The apparatus was cleaned between runs with a 70% ethyl alcohol solution. The number of entries into and the time spent on the anxiogenic open arms were used as conventional spatiotemporal measures of avoidance. The time spent in the central hub area and the total distance traveled in the apparatus were also measured. All the analyses were performed using the EthoVision® video-tracking system (Noldus Inc., The Netherlands). Twenty-four hours after the first trial, each animal was retested in the same apparatus. It is known that the EPM retest effect can show a biologically adaptive form of learning/memory where the experience of a novel environment will swiftly lead to less time being spent in the unsafe open arms (Bertoglio et al., 2005).

QUANTITATIVE RT-PCR

Paternally expressed gene 3 and Pten Gene expression data were obtained from male offspring only (PND 15). Animals were euthanized by CO₂ inhalation and their brain collected for analyses. Total RNA was isolated from whole brain tissue homogenate using Trizol reagent (Ambion, Life technologies, Villebon-sur-Yvette, France) and was quantified by spectroscopy. One microgram of total RNA was reverse transcribed with 100 units of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Real-time PCR reactions were performed in the Mx3005P Agilent (Applied, Life technologies, Villebon-sur-Yvette, France) with fivefold dilution of cDNA, 200 nM of each Taqman primer using Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France). Data were analyzed using the DDCT method and normalized against control samples with mice Gapdh and 18S (Perche et al., 2013). Amplification efficiencies of the target gene and the reference gene are identical. Each measurement was performed three times. The values for the two treated group (GLA 1 and 0.2 mg/kg) were normalized to controls.

STATISTICAL ANALYSIS

Litter was used as the unit of analysis of USVs, all early sensorimotor endpoints and body weight data. Such data were analyzed using non-parametric procedures specially adapted for statistical analysis of small samples ($n < 30$). These statistical procedures have two main advantages over the parametric approach: (1) they do not depend on population assumptions and therefore do not run the risk of not meeting the prerequisite criteria (Siegel and Castellan, 1988), and they have better relative power-efficiency for small samples (Bridge and Sawilowsky, 1999). Independent two-group comparisons were analyzed using the Mann–Whitney *U* test. When considering more than two groups, a global analysis was done first using the Kruskal–Wallis “ANOVA-on-ranks” procedure,

then, when necessary ($p < 0.05$), by Bonferroni *post hoc* analyses (Siegel and Castellan, 1988) including the correction for multiple comparisons. Percentage measurements were analyzed for differences using Chi-squared statistics. qRT-PCR and adult behavioral data were also analyzed using above-mentioned non-parametric procedures.

RESULTS

GLA DID NOT INDUCE TOXICITY IN DAMS

In order to verify that exposure to GLA did not induce adverse effects in dams, we monitored maternal physiological and behavioral parameters both during pregnancy and postnatally. We observed that neither maternal weight gain nor nest building abilities few days before delivery were altered by GLA exposure during pregnancy (Figures 2A,B). In addition, neither the mean number of pups by litter nor their body weight at PND 1 were changed in GLA-exposed offspring compared to controls (Figures 2C,D). We also found that intranasal exposure to GLA did not result in abnormal olfactory skills as non-pregnant C57Bl6 mice exposed to a similar protocol of administration did not display any deficits in the olfactory habituation/dishabituation test (Figure 2E).

GLA-INDUCED DEVELOPMENTAL DEFICITS IN PRE- AND POSTNATALLY EXPOSED OFFSPRING

Investigating the possibility of GLA affecting development, we first determined whether pre- and postnatal exposure to GLA caused abnormal sensorimotor skills in offspring. We focused on three parameters: communication skills, sensorimotor development, and gross developmental features (body/brain weight).

Communication skills

Ultrasonic vocalizations by neonatal mice have been studied both as a manifestation of early communicative behavior of the pup–mother dyad and as a sign of an aversive affective state (Wohr and Schwarting, 2008). We analyzed the pups’ communication skills in response to a 3-min period of separation from the mother, measuring the total number of ultrasound vocalizations emitted from postnatal day (PND) 1 to 5. At the higher dose (1 mg/kg; GLA1), GLA significantly decreased the number of calls emitted ($p = 0.045$) (Figure 3A). No such alterations were observed at the lower dose (0.2 mg/kg; GLA0.2). Total duration of calls was also reduced in GLA1 offspring only (Table S1 in Supplementary Material). Moreover, the proportion of GLA-exposed pups emitting no vocalizations at PND 1 was greater than for the control pups ($p = 0.006$ for GLA1 and $p = 0.092$ for GLA0.2) (Figure 3B).

Sensorimotor development

We analyzed the effects of GLA exposure on the timing of several patterns of sensorimotor development. Acquisition of the acoustic startle reflex was not altered by GLA exposure (Figure 3C). Eyelid opening was delayed in the GLA1 group whereas no effect was noted in GLA0.2 treated offspring (Figure 3D). No effects of GLA were observed on bar grasping (Figure 3E), walking (Figure 3G), righting reflex (Figure 3H), and negative geotaxia (Figure 3I). However, a delayed acquisition of the vertical climbing reflex was observed at the highest dose ($p = 0.034$) (Figure 3F). No effect was observed for the GLA0.2 group.

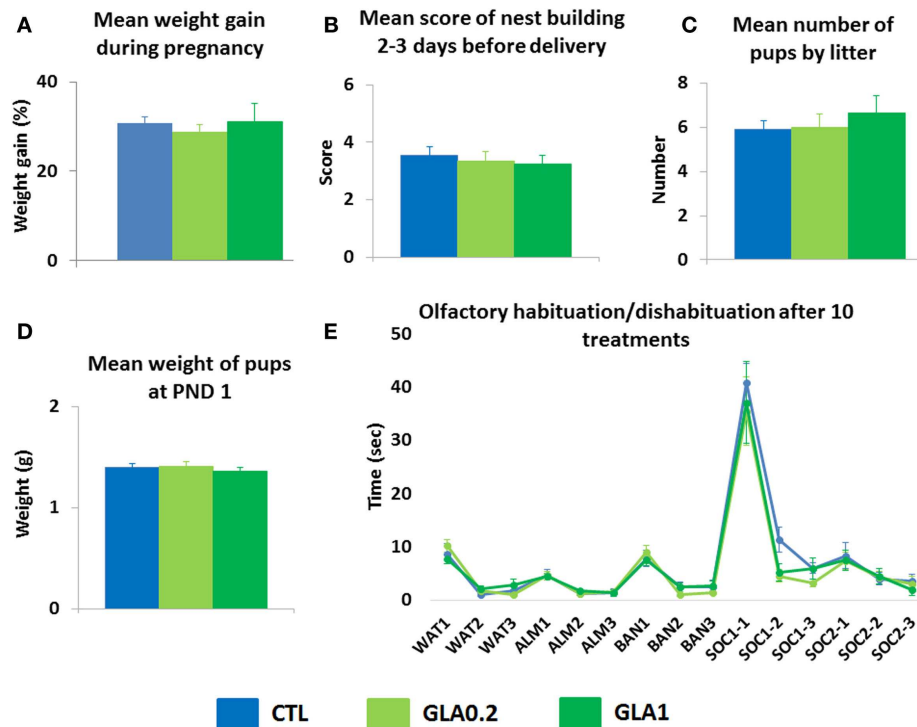


FIGURE 2 | Pre- and postnatal glufosinate ammonium exposure did not alter physiology/behavior in exposed dams. (A) GLA did not modify the percentage of weight gain in pregnant mice. **(B)** GLA did not impair dams' ability to build a nest 2–3 days before delivery data are the mean $\pm$ SEM ($n = 6–8$ dams/group). In addition, GLA did not induce toxic effects on pups during pregnancy as **(C)** the mean number of pups by litter was not different between groups and **(D)** the mean weight of pups at PND 1 was not affected by GLA exposure. Data are the mean $\pm$ SEM ($n = 6–8$ litters/group). **(E)** Intranasal instillation of GLA solutions three times per week did not induce

any olfactory deficits in non-pregnant females exposed to the same number of treatments than pregnant ones (10 treatments). In this task, cotton swabs were used to deliver olfactory stimuli: either non-social (water, almond, and banana) or social (two different odors/cues containing a mixture of urine from a number of male mice). The odor/swab was inserted into a small plastic tube cut open at the bottom. Control mice displayed normal olfactory function with classical habituation/dishabitation to both non-social and social odors. They also displayed a clear preference for social olfactory cues. GLA1 mice displayed. Data are the mean $\pm$ SEM ($n = 8$ /group).

Brain anatomy

We studied the question of whether gross developmental features might be affected by GLA, doing so by measuring the brain and body weight of the pups at PND15. Observations showed that, at PND15, both the absolute brain weight and the absolute body weight were significantly reduced in GLA1 treated offspring compared to controls (**Figures 3J,K**). No effect was seen in GLA02 treated offspring. Calculation of the relative brain weight indicated that pre- and postnatal GLA exposure significantly increased the relative brain weight in mice given the higher dose ($p = 0.046$) while mice given the lower dose displayed slight decrease of the relative brain weight ($p = 0.09$) (**Figure 3L**).

Thus, the highest dose of GLA (1 mg/kg) induced developmental deficits in pre- and postnatally exposed offspring, affecting communication skills and sensorimotor development in early postnatal life, and changing the relative weight of the brain.

EFFECTS OF GLA ON OFFSPRING LASTING INTO ADULTHOOD

To investigate whether these effects on developmental milestones might translate into long-lasting consequences on adult behavior, we analyzed the behavioral repertoire of 3 months old offspring by assaying social parameters namely the three-chambered

sociability test, the social interaction test and the olfactory habituation/dishabitation test, and also emotional skills in the elevated plus maze test.

Social skills

The three-chambered sociability test was used to investigate animals observing voluntary initiation of social interaction and their ability to discriminate social novelty. The animal was placed in a cage and left to explore and initiate social contact with a partner inside a wire container or an identical container holding a novel object. As expected, the control mice spent more time in interaction with the container with the mouse than with the container with the object ($p = 0.0056$; **Figure 4A**). GLA1 mice did not spend any more time with the container with the mouse than with the container with the object (**Figure 4A**). GLA0.2 treated mice, however, had the same response as the controls, displaying more time interacting with the container with the mouse than with the container with the object ($p = 0.009$; **Figure 4A**).

To further document social skills impairment, we paired GLA-exposed mice with both an unfamiliar female on day 1 and an unfamiliar male mouse on day 2, and further explored their social

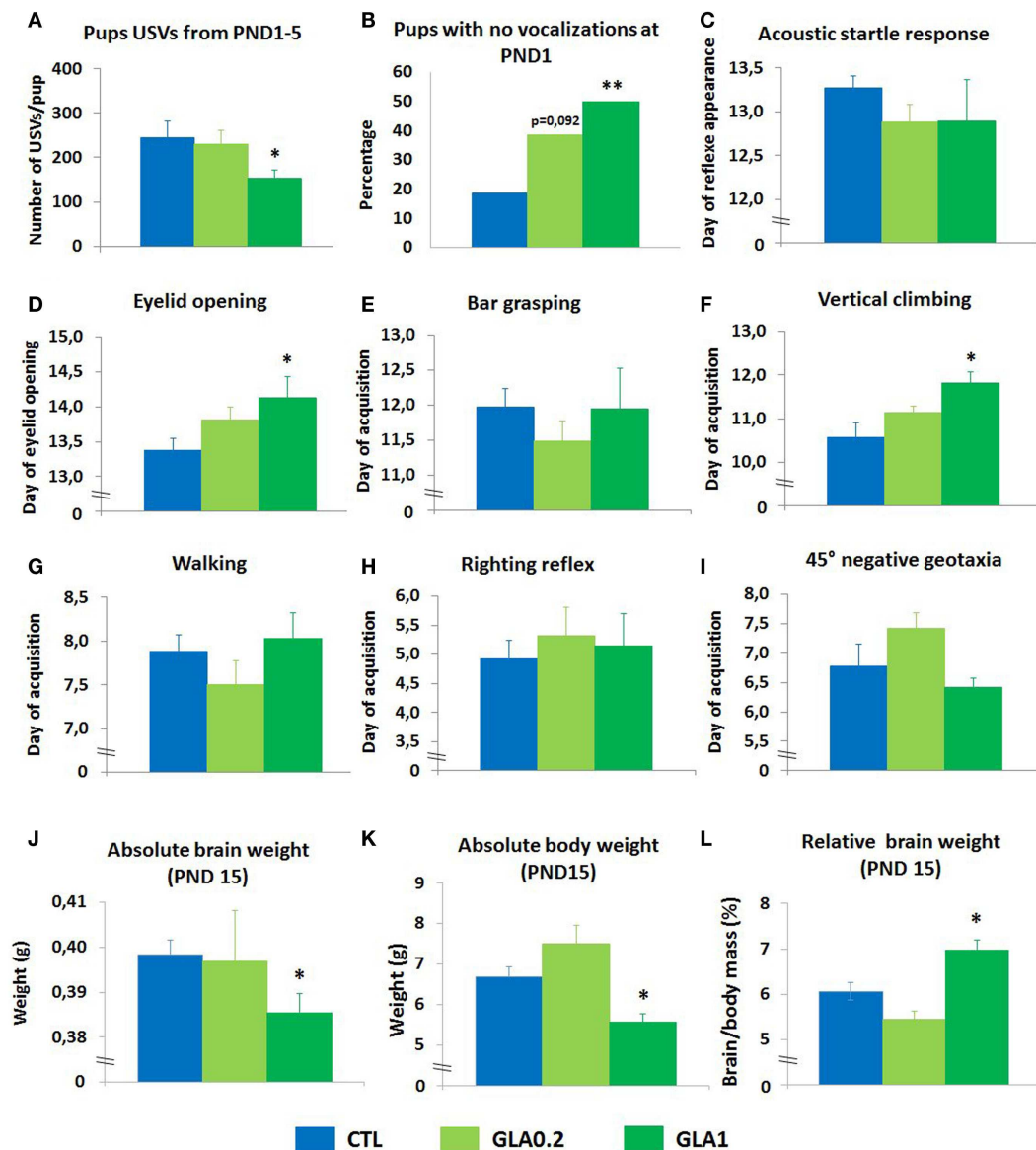


FIGURE 3 | Pre- and postnatal glufosinate ammonium exposure disturbed neurodevelopmental endpoints. (A) Mean total number of vocalizations emitted by pups when separated from their mother from postnatal day 1 to postnatal day 5. Only GLA 1 mg/kg caused a drop in the number of ultrasonic vocalizations emitted by pups when separated from their mothers. Data are the mean $\pm$ SEM ($n = 6-8$ litters/group). **(B)** At postnatal day 1, GLA-exposed mice display dose-dependent communication deficits. Data are presented as the percentage of pups emitting no vocalizations when separated from their mothers. Chi-square analysis was used. **(C)** Acoustic startle reflex data are presented as the average day when pups displayed startle response. Data are the mean $\pm$ SEM, $n = 6-8$ litters/group. **(D)** Eyelid opening data are presented

as the average day when pups had at least one eye open. Data are the mean $\pm$ SEM, $n = 6-8$ litters/group. **(E)** Bar grasping reflex, **(F)** vertical climbing, **(G)** walking reflex, **(H)** righting reflex, and **(I)** 45° negative geotaxia data are presented as the average day when pups were successful in the task. Data are the mean $\pm$ SEM, $n = 6-8$ litters/group. Data indicate that only GLA1-exposed pups display deficits in the acquisition of certain reflexes. At postnatal day 15, neither absolute brain weight **(J)** nor the absolute body weight **(K)** were affected by the treatment while relative body weight **(L)** was significantly increased in GLA1 offspring and slightly decreased in GLA0.2 offspring compared to controls. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, when compared to control mice (CTL). Significant p values are Bonferroni corrected.

abilities in a more naturalistic way. Observations showed that GLA altered male–female interaction: GLA1 mice recorded less affiliation time with the female than the controls ($p = 0.0091$); male–male interaction was not affected (Figure 4B). No alterations were observed in GLA0.2 exposed offspring (Figure 4B).

Social interactions in rodents are based on very complex processes involving efficient detection, recognition, and processing of olfactory information (Vosshall, 2005). We thus conducted an olfactory habituation/dishabituation test known to assess the olfactory system of the mouse, the preference for social rather

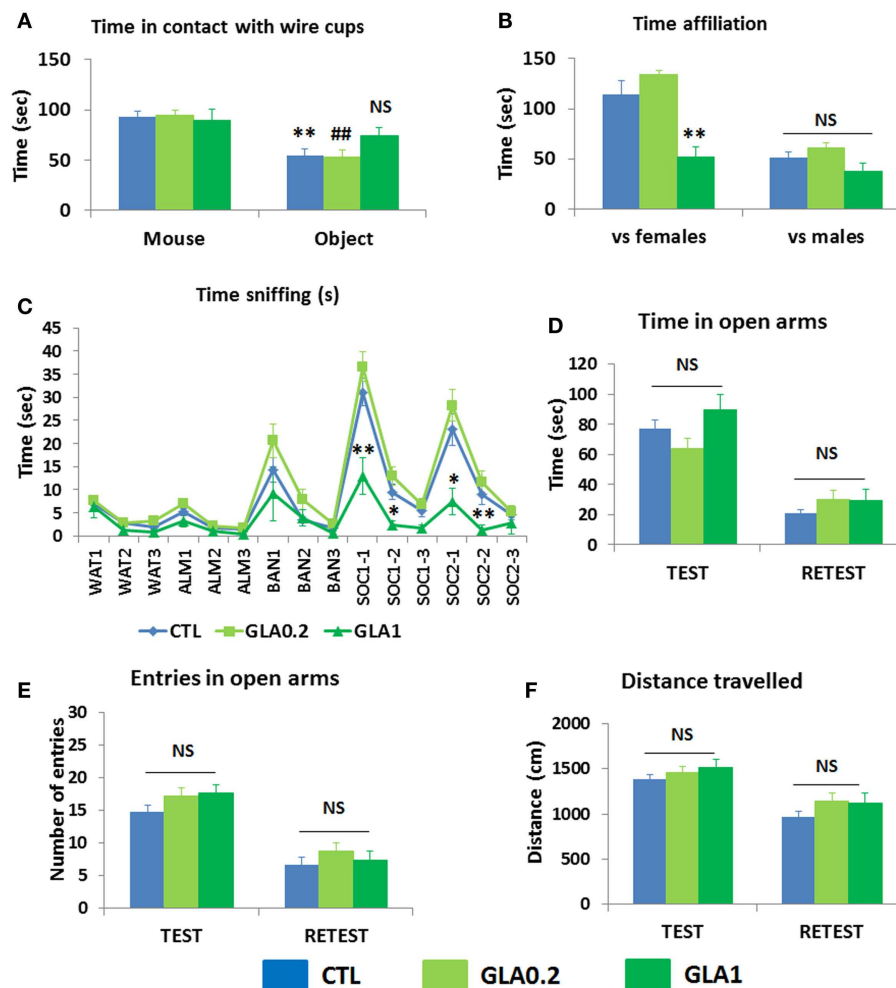


FIGURE 4 | Pre- and postnatal glufosinate ammonium exposure resulted in behavioral alterations in the offspring during adulthood. (A) GLA1

offspring displayed no preference for the chamber containing the social partner, unlike the controls, in the three-chambered sociability test. No effect of GLA0.2 was observed. ** $p < 0.01$ compared to time spent in contact with wire cup containing the mouse in the CTL group; ** $p < 0.01$ compared to time spent in contact with wire cup containing the mouse in the GLA0.2 group.

(B) In the social interaction test, GLA1 mice confronted with females interacted less, but no difference was observed when they were confronted with males. **(C)** In the habituation/dishabituation olfactory test, cotton swabs

were used to deliver olfactory stimuli: either non-social (water, almond, and banana) or social (two different odors/cues containing a mixture of urine from a number of male mice). The odor/swab was inserted into a small plastic tube cut open at the bottom. Control mice displayed normal olfactory function with classical habituation/dishabituation to both non-social and social odors. They also displayed a clear preference for social olfactory cues. GLA1 mice displayed significantly less interest in social cues, but this was not the case for GLA0.2 mice. **(D–F)** GLA did not alter offspring's behavior in the elevated plus maze. All data are presented as means $\pm$ SEM, $n = 11$ –27 mice/group; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to control mice.

than non-social olfactory cues and learning/memory skills related to both social and non-social odors (Silverman et al., 2010). Our findings were that the administration of GLA, both at 1 and 0.2 mg/kg, had no effect on olfactory discrimination skills: the mice were all able to detect new odors of all types, both non-social and social (Figure 4C). GLA did not disturb mice ability to habituate to both social and non-social odors encountered shortly before (Figure 4C). More importantly, compared to controls, GLA1 mice displayed significantly less interest in social olfactory cues, although performance on non-social odors was the same; this effect was not observed in GLA0.2 mice (Figure 4C).

Emotional skills

After exploring sociability in mice, we investigated emotional reactivity. Testing GLA-exposed mice and controls in the EPM, no robust differences were found as no effects of GLA were observed on the number of entries and time spent in the open arms (Figures 4D,E). Emotional memory was assessed by retesting mice 24 h later in the same apparatus. In the retest trial, mice normally avoid open arms and show less interest in exploring the entire apparatus (Rodgers et al., 2011). This is what we observed in CTL, GLA0.2, and GLA1 mice (Figures 4D,E). Moreover, distance traveled by GLA0.2 and GLA1 mice was similar to that traveled by CTL mice (Figure 4F), both during test and retest trials.

Thus, pre- and postnatal exposure to GLA was associated with behavioral changes in offspring that lasted during adulthood and that may be specific to social interaction.

GLA-INDUCED ALTERATIONS ARE ASSOCIATED WITH ALTERED EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN AUTISM-LIKE PHENOTYPES

It is known that a large number of genes are involved in brain weight changes and disturbed social behaviors (Delorme et al., 2013). This is the case for the *Pten* (phosphatase and tensin homolog) gene; *Pten* deregulation has been associated with changes affecting brain weight (Page et al., 2009) and social behavior (Page et al., 2009). Our initial working hypothesis was that the administration of GLA could affect *Pten* expression. Quantitative RT-PCR (qPCR) was conducted to measure whole brain mRNA levels of *Pten* at PND 15 in male controls vs. GLA-treated offspring. We found that pre- and postnatal exposure to GLA1 significantly reduced *Pten* expression, but the opposite effect was observed for the mice given the lower dose of GLA (Figure 5A). Other common gene mutations have been found to be related to anomalies of brain weight in certain cases of sporadic ASD in humans (Klein et al., 2013), e.g., for the Chromodomain Helicase DNA-binding-8 (*Chd8*) gene (O'roak et al., 2012). We therefore measured the level of *Chd8* expression in the whole brain of GLA-treated male offspring at PND 15 by qPCR. We found *Chd8* to be only slightly down-regulated in GLA1 mice compared to control mice but this effect was not statistically significant. No change was observed in GLA0.2 mice (Figure 5B).

Among genes involved in the regulation of social behavioral patterns, few are specifically related to male–female interactions. The Paternally Expressed Gene 3 (*Peg3*) has been shown to play a key role in the regulation of male–female affiliative behaviors (Swaney et al., 2008). We therefore studied the effect of pre- and postnatal administration of GLA to whole brain mRNA levels of *Peg3*, measured at PND 15 in male offspring. *Peg3* expression was significantly down-regulated in GLA1 mice, although no change was observed in GLA0.2 mice (Figure 5C).

Thus, pre- and postnatal exposure to GLA alters the developmental expression of genes related to ASD-like symptoms.

DISCUSSION

The major concern of this kind of study (pre- and postnatal exposure) is the putative toxic effects of GLA on maternal physiology and/or behavior. Indeed, we cannot totally rule out this possibility, in particular regarding long-term effects of pre- and postnatal exposure to GLA on social behaviors in the offspring. Indeed, it is now well-known that early social environment (maternal care and peer interactions) has a profound impact on offspring's abilities in building normal social competencies (Branchi et al., 2013). However, we collected physical and behavioral data during pregnancy showing that mothers exposed to GLA were not different from their control counterparts as maternal weight gain and nest building capacities were not changed by the treatment. Consequently, behavioral changes observed in GLA-exposed offspring were not likely to result from any physiological and or behavioral deficits induced in mothers. Similarly, long-term effects of pre- and postnatal exposure to GLA could be the consequence of a direct effect of GLA on females' olfactory abilities given that it was instilled intranasally. Indeed, in mice as in many other mammals, olfactory cues are extensively used in many aspects of maternal care to ensure the coordination of mother–infant interactions and consequently the normal development of the offspring. Therefore, disturbed perception of the smell of the offspring could result in impairments in maternal care and contribute to abnormal sociability during the adulthood of the offspring (Starr-Phillips and Beery, 2014). However, data collected in non-pregnant mice exposed to a similar protocol of treatment with GLA, showed that this procedure was not harmful and thus, was unable to be the cause of the developmental and/or long-term behavioral changes observed in GLA-exposed offspring.

Isolation-induced vocalizations are important communication signals eliciting maternal care behaviors. This type of behavior has received particular attention in respect of human language understanding. Indeed, there have been a number of study indicating specific pup and adult USV irregularities in mice with alterations in genes such as FOX P2 (Shu et al., 2005) and oxytocin gene OXT (Liu et al., 2008) (i.e., implicated in language and social behavior, respectively) as well as neuroligin-4 and neuroligin-3, which

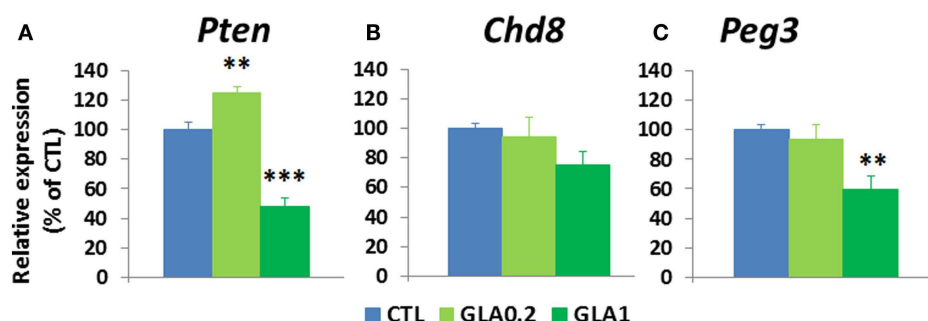


FIGURE 5 | Pre- and postnatal glufosinate ammonium exposure altered molecular parameters in the offspring brain at postnatal day 15.

(A) Whole brain quantitative RT-PCR analysis of *Pten* revealed that GLA0.2 increased while GLA1 reduced *Pten* transcripts in comparison to controls.

(B) Whole brain expression of *Chd8* was not changed in GLA1 and GLA0.2 mice. (C) *Peg3* transcripts were reduced only in GLA1 mice. Each value is the mean $\pm$ SEM ($n = 4-7$ pups/group). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Significant p values are Bonferroni corrected.

have been associated with ASD (Fischer and Hammerschmidt, 2011). According to some authors, this type of behavior might be reflective of the animal's drive to communicate (Holtzman et al., 1996). In addition, pups USVs have also been involved in emotionality, an increase in vocalizations being observed in response to anxiogenic drugs, and a decrease in response to anxiolytics (Hodgson et al., 2008). Thus the reported reduction of USVs in GLA-exposed offspring may be evidence of disturbances in neuronal networks underlying emotional processes. However, the fact that no changes were observed in anxiety levels in adult offspring suggested that the neural circuitry underlying emotion-based behaviors was not affected by pre- and postnatal exposure to GLA. As a consequence, GLA-induced abnormalities in USVs emission were likely to reflect alterations in mother–infant communicative skills. As previously said, many studies have reported unusual repertoires of USVs during infancy in mouse models of ASD, usually interpreted as communication impairments: this is the case for neuroligin-2 (Wohr et al., 2013) and neuroligin-4 (Ju et al., 2014).

Early after birth, we also observed anomalies in postnatal development in GLA1-exposed mice that is another pathologic feature frequently observed in mice models of ASD (Wohr et al., 2013). Indeed, we found that GLA1-exposed pups displayed abnormal timing of certain developmental processes. These reflexes in neonate pups are indices used to detect abnormalities in brain maturation (Fox, 1965), suggesting that the administration of GLA may have negative effects on the processes impacting on a wide range of cerebral structures. In association with impairments in social interaction, abnormal communication, and alterations in sensorimotor development constitute the core symptoms of ASD (Apa, 2000). This set of alterations are reminiscent of mice models of autism-like deficits. The effect of GLA exposure on pups' relative brain weight also strengthened the link between autism-like deficits and pre- and postnatal exposure to GLA. Interestingly, anatomical and cellular abnormalities in the brain of ASD individuals have included reports of alterations in brain weight (Fombonne et al., 1999). Therefore, abnormalities observed in our study are in line with human studies (Courchesne et al., 2001).

In addition, pre- and postnatal exposure to GLA had a strong effect on the social skills of the offspring when adults, with their affiliative behavior showing significant alterations in three tasks classically used as behavioral phenotyping assays for mouse models of autism (Silverman et al., 2010). The laboratory mouse is a social species that engages in high levels of social interactions, sexual/parenting behaviors, and territorial/aggressive behaviors (Arakawa et al., 2008). In the present study, we showed that several aspects of the social repertoire of the mouse were affected by maternal GLA exposure, in particular sociability, i.e., inability to distinguish the social partner from the novel object in three-chambered sociability test. Male–female interactions were impaired, but no change was found in male–male interactions, suggesting that mating behavior may be specifically affected in GLA-exposed offspring. This finding tallies with reports of reduced levels of *Peg3* mRNA in the brain of GLA1 mice, as *Peg3* mutation in male mice is involved in male–female interactions (Swaney et al., 2008). This deficit was attributed to impairments

in the main olfactory system rather than the accessory olfactory system. Further evidence of this can be found in animal studies, testing with nasal perfusion of zinc sulfate, which disrupts the main olfactory bulb but leaves the accessory system functionally intact (Powers and Winans, 1975). This was found to have minor effects on male–male interactions (Bean, 1982), yet completely disrupted mating behavior, regardless of whether the mice were sexually naive or experienced (Keller et al., 2006). Together, the data strongly suggest that anomalies in the main olfactory system may be involved in GLA-induced disruption of social behaviors.

Further evidence for the link between pre- and postnatal exposure to GLA and ASD-like deficits can be found in certain ASD susceptibility genes that were deregulated in exposed offspring. *Pten* is one of the many genes closely associated with autism-like symptoms, in particular with brain overgrowth and social deficits (Kwon et al., 2006; Page et al., 2009). One unexpected finding was that *Pten* mRNA levels in the brain were much lower in mice exposed to 1 mg/kg GLA, matching the increased relative brain weight in the same mice. Many reports documented the close link between *Pten* inactivation and impairments in social behaviors. Page et al., for example, reported that *Pten* haploinsufficient mice displayed abnormal affiliative behaviors associated with brain overgrowth (Page et al., 2009); while conditional *Pten* null mice displayed impaired social interactions and no preference for social novelty (Kwon et al., 2006). Even if the primary goal of the present study was not to unraveling molecular mechanisms involved in disturbing effects of pre- and postnatal exposure to GLA, our molecular data strengthened the hypothesis of a link between early life exposure to pesticides, in our case the herbicide GLA, and autism-like deficits.

Considering all our data, we need to address the question of whether our findings in mice have any relevance to the link between pesticide exposure and ASDs in humans. For a number of years now, studies have shown that an unfavorable environment during early development may lead to neurodevelopmental deficits causing a broad range of lifelong problems affecting physical and mental health (Capra et al., 2013). Epidemiological investigations have recently showed that low-level pre- and postnatal exposure to pesticides is associated with abnormal behaviors and impaired mental skills (Rauh et al., 2006; Eskenazi et al., 2007). No such effects had been reported for GLA before the present study. This is now of crucial importance as one of GLA metabolites 3-methylphosphinopropionic acid (3-MPPA) have recently been detected in the blood of pregnant women and their fetuses (Aris and Leblanc, 2011). The situation is even more disturbing as most pregnant women are exposed to many different chemicals (Woodruff et al., 2011). Circulating levels of pesticide cocktails may be asymptomatic in pregnant women, but affect their fetuses as chemicals may interfere with neurobiological substrates underlying ASD-like symptoms, in particular at critical stages of neurodevelopment. Whenever there is a genetic susceptibility to such disorders, the adverse effects of pesticides may increase the risk of the fetus and later person developing ASD-like symptoms. Our findings clearly highlight the importance to build up our knowledge of possible harmful effects of low-level pre- and postnatal exposure to pesticides. This is a relevant and topical issue as

some governmental reports have noted that early exposure (pre and postnatal) to low or very low doses of pesticides is not usually covered by the tests required for regulatory approval of pesticides, and therefore that it is impossible to estimate such adverse effects (Bonnefoy, 2012).

In conclusion, we document that GLA has pervasive, harmful effects when administered during the highly sensitive pre- and postnatal periods. At the behavioral level, these effects are strikingly reminiscent of those observed in animal models of ASDs. All data presented on the effects of GLA on behavior and brain abnormalities pave the way for supplementary analyses: whole brain microarray analysis is needed to gain a better understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the neurodevelopmental effects of GLA. Such an analysis will no doubt contribute to our knowledge of the constellations of genes involved in pathological processes mediated by pre- and postnatal exposure to GLA. One hypothesis is that GLA (or its metabolites) acts on target-signaling systems that establish the basic patterns of connectivity, from early neuronal migration to disruption of later postnatal events that enhance or alter neuronal connections, such as dendritic growth or synapse formation/removal. The present data also raise important questions regarding the acceptable daily intake (ADI) and whether this covers the total amount of a substance that can be ingested daily over a lifetime without adverse effects. The ADI value is determined on the basis of the no observed adverse effect level (NOAEL), i.e., the level where a substance shows no toxic effects. The lowest NOAEL for GLA has been set at 2.1 mg/kg/day on the basis of on a 2-year chronic feeding study in rats (EPA, 2011). The standard procedure for regulatory testing typically involves a series of tests to determine the value. In our study, we observed harmful effects of GLA at a dose of 1 mg/kg administered three times a week during both gestation and lactation. We can thus calculate that female mice were given 3 mg/kg a week, the equivalent of 0.4286 mg/kg/day. This is approximately five times lower than the EPA approved dose (EPA, 2011). Our data can thus provide strong evidence to argue that the current NOAEL values must be revised.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Stéphane Mortaud, Céline Montécot-Dubourg, Jacques Pichon, Olivier Richard, Arnaud Menuet, Olivier Perche, Bernard Jegou, and Anthony Laugeray designed the study. Anthony Laugeray, Ameziane Herzine, Marine Aguillon-Naury, Olivier Richard, Céline Montécot-Dubourg, and Stéphane Mortaud performed pre- and postnatal exposure to glufosinate. Marine Aguillon-Naury performed toxicologic analyses in non-pregnant, pregnant, and lactating female mice. Anthony Laugeray, Ameziane Herzine, Marine Aguillon-Naury, Olivier Richard, Céline Montécot-Dubourg, Betty Hébert, and Stéphane Mortaud performed behavioral experiments/data analyses in pups. Anthony Laugeray, Ameziane Herzine, Olivier Richard, Céline Montécot-Dubourg, and Stéphane Mortaud collected brain samples from the offspring. Ameziane Herzine, Séverine Mazaud, Laurianne Lesné, and Olivier Perche performed molecular experiments/data analyses in the offspring. Anthony Laugeray and Betty Hébert performed behavioral experiments/data analyses during offspring

adulthood. Anthony Laugeray wrote the manuscript. Stéphane Mortaud, Céline Montécot-Dubourg, Olivier Perche, Olivier Richard, Arnaud Menuet, Bernard Jegou, Ameziane Herzine, Betty Hébert, Séverine Mazaud, Laurianne Lesné, Sylvain Briault, and Jacques Pichon brought significant contributions to manuscript editing. Bernard Jegou, Jacques Pichon, Arnaud Menuet, Sylvain Briault, and Stéphane Mortaud performed English editing.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French National Research Agency – ANR (CESA-10-007 – NEUROPEST), and Region Centre (Doctoral fellowship to Ameziane Herzine). The authors wish to thank Dr. Valérie Quesniaux for English editing. Part of the research was presented at the third PPTOX conference (Paris, May 14–16, 2012).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnbeh.2014.00390/abstract>

REFERENCES

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th Edn. Arlington: APA.
- Arakawa, H., Blanchard, D. C., Arakawa, K., Dunlap, C., and Blanchard, R. J. (2008). Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1236–1248. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.05.012
- Aris, A., and Leblanc, S. (2011). Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in eastern townships of Quebec, Canada. *Reprod. Toxicol.* 31, 528–533. doi:10.1016/j.reprotox.2011.02.004
- Ay, Z., Mihaly, R., Cserhati, M., Kotai, E., and Pauk, J. (2012). The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic spring wheat (*Triticum aestivum* L.) constitutively expressing the bar gene. *ScientificWorldJournal* 2012, 657945. doi:10.1100/2012/657945
- Bak, L. K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–653. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
- Barouki, R., Gluckman, P. D., Grandjean, P., Hanson, M., and Heindel, J. J. (2012). Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ. Health* 11, 42. doi:10.1186/1476-069X-11-42
- Bean, N. J. (1982). Modulation of agonistic behavior by the dual olfactory system in male mice. *Physiol. Behav.* 29, 433–437. doi:10.1016/0031-9384(82)90262-1
- Berkowitz, G. S., Obel, J., Deych, E., Lapinski, R., Godbold, J., Liu, Z., et al. (2003). Exposure to indoor pesticides during pregnancy in a multiethnic, urban cohort. *Environ. Health Perspect.* 111, 79–84. doi:10.1289/ehp.5619
- Bertoglio, L. J., Anzini, C., Lino-De-Oliveira, C., and Carobrez, A. P. (2005). Enhanced dorsolateral periaqueductal gray activity counteracts the anxiolytic response to midazolam on the elevated plus-maze trial 2 in rats. *Behav. Brain Res.* 162, 99–107. doi:10.1016/j.bbr.2005.03.010
- Bonnefoy, N. (2012). *Rapport D'information n°42 Sur les Pesticides et leur Impact Sur la Santé et l'environnement*. Available at: <http://www.senat.fr/rap/r12-042-1/r12-042-11.pdf>
- Branchi, I., Curley, J. P., D'andrea, I., Cirulli, F., Champagne, F. A., and Alleva, E. (2013). Early interactions with mother and peers independently build adult social skills and shape BDNF and oxytocin receptor brain levels. *Psychoneuroendocrinology* 38, 522–532. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.07.010
- Bridge, P. D., and Sawilowsky, S. S. (1999). Increasing physicians' awareness of the impact of statistics on research outcomes: comparative power of the t-test and and Wilcoxon rank-sum test in small samples applied research. *J. Clin. Epidemiol.* 52, 229–235. doi:10.1016/S0895-4356(98)00168-1
- Calas, A. G., Richard, O., Meme, S., Beloeil, J. C., Doan, B. T., Gefflaut, T., et al. (2008). Chronic exposure to glufosinate-ammonium induces spatial memory

- impairments, hippocampal MRI modifications and glutamine synthetase activation in mice. *Neurotoxicology* 29, 740–747. doi:10.1016/j.neuro.2008.04.020
- Capra, L., Tezza, G., Mazzei, F., and Boner, A. L. (2013). The origins of health and disease: the influence of maternal diseases and lifestyle during gestation. *Ital. J. Pediatr.* 39, 7. doi:10.1186/1824-7288-39-7
- Cerdeira, A. L., and Duke, S. O. (2006). The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review. *J. Environ. Qual.* 35, 1633–1658. doi:10.2134/jeq2005.0378
- Courchesne, E., Karns, C. M., Davis, H. R., Ziccardi, R., Carper, R. A., Tigue, Z. D., et al. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. *Neurology* 57, 245–254. doi:10.1212/WNL.57.2.245
- Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2013). Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat. Med.* 19, 685–694. doi:10.1038/nm.3193
- EPA. (2011). *Pesticides Industry Sales and Usage 2006 and 2007 Market Estimates*. Washington, DC. Available at: http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf
- Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D. B., Johnson, C., et al. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ. Health Perspect.* 115, 792–798. doi:10.1289/ehp.9828
- Fenske, R. A., Hidy, A., Morris, S. L., Harrington, M. J., and Keifer, M. C. (2002a). Health and safety hazards in Northwest agriculture: setting an occupational research agenda. *Am. J. Ind. Med.* 2, 62–67. doi:10.1002/ajim.10081
- Fenske, R. A., Lu, C., Barr, D., and Needham, L. (2002b). Children's exposure to chlorpyrifos and parathion in an agricultural community in central Washington State. *Environ. Health Perspect.* 110, 549–553. doi:10.1289/ehp.02110549
- Fischer, J., and Hammerschmidt, K. (2011). Ultrasonic vocalizations in mouse models for speech and socio-cognitive disorders: insights into the evolution of vocal communication. *Genes Brain Behav.* 10, 17–27. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00610.x
- Fombonne, E., Roge, B., Claverie, J., Courty, S., and Fremolle, J. (1999). Microcephaly and macrocephaly in autism. *J. Autism Dev. Disord.* 29, 113–119. doi:10.1023/A:1022129017592
- Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13, 234–241. doi:10.1016/0003-3472(65)90041-2
- Hodgson, R. A., Guthrie, D. H., and Varty, G. B. (2008). Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 341–348. doi:10.1016/j.pbb.2007.09.005
- Holtzman, D. M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D. J., Daniels, S. E., et al. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13333–13338. doi:10.1073/pnas.93.23.13333
- Ju, A., Hammerschmidt, K., Tantra, M., Krueger, D., Brose, N., and Ehrenreich, H. (2014). Juvenile manifestation of ultrasound communication deficits in the neuroligin-4 null mutant mouse model of autism. *Behav. Brain Res.* 270, 159–164. doi:10.1016/j.bbr.2014.05.019
- Julvez, J., and Grandjean, P. (2009). Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. *Ind. Health* 47, 459–468. doi:10.2486/indhealth.47.459
- Keller, M., Douhard, Q., Baum, M. J., and Bakker, J. (2006). Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulfate – lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behavior in male mice. *Chem. Senses* 31, 753–762. doi:10.1093/chemse/bjl018
- Klein, S., Sharifi-Hannauer, P., and Martinez-Agosto, J. A. (2013). Macrocephaly as a clinical indicator of genetic subtypes in autism. *Autism Res.* 6, 51–56. doi:10.1002/aur.1266
- Kwon, C. H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., et al. (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* 50, 377–388. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.023
- Lapouble, E., Montecot, C., Sevestre, A., and Pichon, J. (2002). Phosphinothricin induces epileptic activity via nitric oxide production through NMDA receptor activation in adult mice. *Brain Res.* 957, 46–52. doi:10.1016/S0006-8993(02)03597-7
- Liu, H. X., Lopatina, O., Higashida, C., Tsuji, T., Kato, I., Takasawa, S., et al. (2008). Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice. *Neurosci. Lett.* 448, 67–70. doi:10.1016/j.neulet.2008.09.084
- Meme, S., Calas, A. G., Montecot, C., Richard, O., Gautier, H., Gefflaut, T., et al. (2009). MRI characterization of structural mouse brain changes in response to chronic exposure to the glufosinate ammonium herbicide. *Toxicol. Sci.* 111, 321–330. doi:10.1093/toxsci/kfp174
- Nakaki, T., Mishima, A., Suzuki, E., Shintani, F., and Fujii, T. (2000). Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* 290, 209–212. doi:10.1016/S0304-3940(00)01363-X
- O'roak, B. J., Vives, L., Fu, W., Egerton, J. D., Stanaway, I. B., Phelps, I. G., et al. (2012). Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619–1622. doi:10.1126/science.1227764
- Page, D. T., Kuti, O. J., Prestia, C., and Sur, M. (2009). Haploinsufficiency for Pten and serotonin transporter cooperatively influences brain size and social behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1989–1994. doi:10.1073/pnas.0804428106
- Park, H. Y., Lee, P. H., Shin, D. H., and Kim, G. W. (2006). Anterograde amnesia with hippocampal lesions following glufosinate intoxication. *Neurology* 67, 914–915. doi:10.1212/01.wnl.0000233828.18399.e8
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., and Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167. doi:10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Perche, O., Menuet, A., Marcos, M., Liu, L., Paris, A., Utami, K. H., et al. (2013). Combined deletion of two condensin II system genes (NCAPG2 and MCPH1) in a case of severe microcephaly and mental deficiency. *Eur. J. Med. Genet.* 56, 635–641. doi:10.1016/j.ejmg.2013.07.007
- Powers, J. B., and Winans, S. S. (1975). Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science* 187, 961–963. doi:10.1126/science.1145182
- Rauh, V. A., Garfinkel, R., Perera, F. P., Andrews, H. F., Hoepner, L., Barr, D. B., et al. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 118, e1845–e1859. doi:10.1542/peds.2006-0338
- Rodgers, R. J., Harvest, H., Hassall, C., and Kaddour, L. A. (2011). D-cycloserine enhances memory consolidation in the plus-maze retest paradigm. *Behav. Neurosci.* 125, 106–116. doi:10.1037/a0022343
- Shu, W., Cho, J. Y., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G. A., et al. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9643–9648. doi:10.1073/pnas.0503739102
- Siegel, S., and Castellan, N. J. (eds) (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York: McGraw-Hill.
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., and Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 490–502. doi:10.1038/nrn2851
- Simcox, N. J., Fenske, R. A., Wolz, S. A., Lee, I. C., and Kalman, D. A. (1995). Pesticides in household dust and soil: exposure pathways for children of agricultural families. *Environ. Health Perspect.* 103, 1126–1134. doi:10.1289/ehp.951031126
- Starr-Phillips, E. J., and Beery, A. K. (2014). Natural variation in maternal care shapes adult social behavior in rats. *Dev. Psychobiol.* 56, 1017–1026. doi:10.1002/dev.21182
- Swaney, W. T., Curley, J. P., Champagne, F. A., and Keverne, E. B. (2008). The paternally expressed gene Peg3 regulates sexual experience-dependent preferences for estrous odors. *Behav. Neurosci.* 122, 963–973. doi:10.1037/a0012706
- Vosshall, L. B. (2005). Social signals: the secret language of mice. *Curr. Biol.* 15, R255–R257. doi:10.1016/j.cub.2005.03.027
- Watanabe, T. (1997). Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture. *Neurosci. Lett.* 222, 17–20. doi:10.1016/S0304-3940(97)13330-4
- Watanabe, T., and Iwase, T. (1996). Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture. *Teratog. Carcinog. Mutagen* 16, 287–299. doi:10.1002/(SICI)1520-6866(1996)16:6<287::AID-TCM1>3.0.CO;2-E
- Whyatt, R. M., Camann, D. E., Kinney, P. L., Reyes, A., Ramirez, J., Dietrich, J., et al. (2002). Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. *Environ. Health Perspect.* 110, 507–514. doi:10.1289/ehp.02110507

- Wohr, M., and Schwarting, R. K. (2008). Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav. Neurosci.* 122, 310–330. doi:10.1037/0735-7044.122.2.310
- Wohr, M., Silverman, J. L., Scattoni, M. L., Turner, S. M., Harris, M. J., Saxena, R., et al. (2013). Developmental delays and reduced pup ultrasonic vocalizations but normal sociability in mice lacking the postsynaptic cell adhesion protein neuroligin2. *Behav. Brain Res.* 251, 50–64. doi:10.1016/j.bbr.2012.07.024
- Woodruff, T. J., Zota, A. R., and Schwartz, J. M. (2011). Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003–2004. *Environ. Health Perspect.* 119, 878–885. doi:10.1289/ehp.1002727
- Yang, M., and Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr. Protoc. Neurosci.* 8, 24. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48
- Yee, B. K., Zhu, S. W., Mohammed, A. H., and Feldon, J. (2007). Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice. *J. Neural. Transm.* 114, 431–444. doi:10.1007/s00702-006-0548-9
- Young, J. G., Eskenazi, B., Gladstone, E. A., Bradman, A., Pedersen, L., Johnson, C., et al. (2005). Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology* 26, 199–209. doi:10.1016/j.neuro.2004.10.004
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Received: 19 September 2014; accepted: 20 October 2014; published online: 20 November 2014.
- Citation: Laugeray A, Herzine A, Perche O, Hébert B, Aguilon-Naury M, Richard O, Menuet A, Mazaud-Guittot S, Lesné L, Briault S, Jegou B, Pichon J, Montécot-Dubourg C and Mortaud S (2014) Pre- and postnatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice. *Front. Behav. Neurosci.* 8:390. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00390
- This article was submitted to the journal *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.
- Copyright © 2014 Laugeray, Herzine, Perche, Hébert, Aguilon-Naury, Richard, Menuet, Mazaud-Guittot, Lesné, Briault, Jegou, Pichon, Montécot-Dubourg and Mortaud. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Discussion

Générale

Discussion générale

Les transitions économiques à l'ère de la mondialisation méritent un regard neuf sur les risques neurologiques associés aux risques environnementaux. Ceux-ci sont entraînés par l'expansion industrielle, les changements climatiques et la croissance démographique. Dans les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire, le risque de maladies du cerveau liées à l'environnement est augmenté de plusieurs fois par manque d'infrastructures, de règles de sécurité et de mesures de protection de l'environnement. Les troubles neurologiques peuvent se produire à la suite d'une exposition directe à des facteurs de stress chimiques ou non chimiques. Les susceptibilités individuelles à des maladies liées à l'exposition sont modifiées par des facteurs génétiques et épigénétiques. Les programmes de recherches dans la santé environnementale doivent surtout se concentrer sur l'élucidation de toutes les sources d'exposition pour définir la notion de « l'exposome » (la mesure de toutes les expositions d'une personne dans leur vie et comment ces expositions affectent sa santé). Les dommages du système nerveux conduisent souvent à des symptômes sensoriels, des problèmes de comportement, des déficits cognitifs et des troubles psychiatriques.

Les produits chimiques ayant un potentiel neurotoxique, auxquels les gens sont couramment exposés, sont référencés (Tshala-Katumbay et al., 2015). Les lésions cérébrales liées à ces expositions peuvent résulter de l'action de ces produits en interférant dans la neurotransmission par mimétisme moléculaire des neurotransmetteurs, ou en réagissant avec des protéines ou avec l'ADN et provoquer ainsi des dysfonctionnements cruciaux.

L'utilisation des pesticides est une préoccupation importante dans le domaine de la santé mentale. En effet, ces produits chimiques sont parfois utilisés lors de tentatives de suicide (Eddleston and Phillips, 2004) et ont été directement associés à des troubles mentaux. Les taux de suicide par ingestion de produits phytosanitaires sont plus élevés dans les zones où les pesticides organophosphorés sont utilisés (Parron et al., 1996). Par ailleurs l'exposition chronique à ces produits a été démontrée comme étant un facteur augmentant les risques de développer la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et les troubles du spectre autistique (Baldi et al., 2003; Fleming et al., 2003).

L'exposition périnatale aux pesticides peut induire une neurotoxicité développementale. Elle a été associée, via des études épidémiologiques, à des retards de développement et à des neuropathologies telles que l'autisme (Shelton et al., 2014).

Nous nous sommes interrogés sur la neurotoxicité d'une exposition périnatale à de très faibles doses de GLA et par voie nasale afin d'explorer l'hypothèse de la proximité résidentielle des femmes enceintes pendant la grossesse aux champs agricoles traités aux pesticides. Nos résultats indiquent que le GLA perturbe la neurogenèse et la migration des neuroblastes et cela conduit à l'apparition de phénotypes ASD-like chez les souris exposées. L'étude épidémiologique menée par Shelton et al. en 2014 a révélé une augmentation de 60% de la prévalence des cas de troubles du spectre autistique chez les enfants des femmes enceintes vivant à proximité des champs traités par des organophosphorés (Shelton et al., 2014). Notre étude sur le GLA renforce les preuves liant les pesticides, en particulier les organophosphorés, au développement des pathologies de retard mental et d'autisme, mais nous ne sommes pas en mesure de comparer réellement nos résultats avec ceux de Shelton *et al.* En effet, il y a peu de données sur les mères et les enfants autres que les caractéristiques démographiques de base, de façon à ajuster les facteurs important pour le neurodéveloppement, tels que les facteurs génétiques et l'utilisation des vitamines prénatales.

Les effets neurotoxiques du GLA sont multiples et se manifestent à plusieurs niveaux. En effet, on note des perturbations allant du cytosquelette jusqu'aux altérations comportementales des souris exposées via leur mère.

1) Du cytosquelette au comportement

Les effets du GLA à faibles doses pendant la période périnatale sont nombreux. En effet, notre étude a démontré que le GLA a des effets néfastes allant du niveau moléculaire, comme la polyglutamylation du cytosquelette, en passant au niveau de la physiologie cellulaire, affectant ainsi la prolifération et la migration des neuroblastes, jusqu'à la modification du comportement à long terme de l'animal lui-même. Plusieurs études mettent en relation l'implication du cytosquelette et de la polyglutamylation dans la prolifération et la migration cellulaire (Janke and Bulinski, 2011; Magiera and Janke, 2014; Ohta et al., 2015). Les défauts de migration des neuroblastes observés

chez les animaux exposés au GLA pourraient donc au moins en partie, être liés à des perturbations du cytosquelette.

Les neuroblastes générés dans la SVZ migrent le long du courant rostral pour atteindre les BO où ils s'intègrent au réseau neuronal. Ils jouent un rôle important dans la communication olfactive qui est principalement médiée par les neurones sensoriels (Dulac and Torello, 2003). Il a été démontré qu'une migration anormale de ces cellules est liée à des déficits structurels des BO à et des troubles des comportements olfactifs des souris (Zou et al., 2012). Cette migration se fait d'une manière très particulière et très spécifique aux neuroblastes. La perturbation durant la période périnatale de cette migration peut avoir ou conduire à des conséquences sur le développement et le fonctionnement du cerveau. Il a été, en effet, démontré qu'une altération de cette migration dans le jeune âge avait des conséquences irréversibles à long terme chez la souris, notamment des altérations profondes de la capacité de ces souris pour interagir avec d'autres souris (Wei et al., 2011).

De nombreuses études montrent que le bulbe olfactif jouerait un rôle critique dans différents types d'apprentissage et de mémoire olfactive. Il permettrait entre autres, le stockage transitoire de la mémoire olfactive, grâce à la neurogenèse bulbaire (Lledo and Saghatelian, 2005).

Parmi tous les moyens de communication développés par les mammifères, l'odorat est le plus ancien et le plus répandu (Swaney and Keverne, 2009). En effet l'olfaction joue un rôle dans la mise en place des comportements sociaux comme les comportements de fuite, de recherche de nourriture, de recherche du partenaire sexuel, du comportement maternel ... (Hebb et al., 2004; Lin et al., 2005). L'olfaction joue un rôle très important dans la communication entre individus, en apportant des informations sur les partenaires (âge, sexe, état de santé, état reproducteur...). Chez les rongeurs, le système olfactif est extrêmement développé. Selon Slotnick, ils auraient la « machinerie neuronale pour penser avec leur nez » (Slotnick, 2001).

La perturbation de ce système peut avoir des conséquences considérables dans le comportement de l'animal. Dans notre cas, le glufosinate d'ammonium perturbe de nombreux aspects des comportements sociaux des souris exposées pendant la période périnatale. Ces souris présentent des phénotypes similaires aux troubles du spectre autistique. La fonction olfactive est un bon biomarqueur des

maladies neurodégénératives (Tonacci et al., 2015). L'association entre les troubles olfactifs et les troubles du spectre autistique a déjà été établi même chez l'Homme (Luisier et al., 2015; Tonacci et al., 2015; Wicker et al., 2016). En effets les enfants atteints des TSA ont des problèmes de perception des odeurs (Luisier et al., 2015).

De plus l'analyse du transcriptome cérébral des animaux exposés *via* l'exposition maternelle, à de faibles doses de GLA en périnatal nous a montré la dérégulation d'un nombre important de gènes. Parmi eux, près de 43 % des gènes connus comme étant impliqués dans les déficits des troubles autistiques référencés dans la base de données AGD (*Autism genetic database*) (Matuszek and Talebizadeh, 2009) en font partie (*annexe*).

Les effets du GLA sont multiples et très importants probablement du fait que ce dernier soit administré par voie intranasale dans une période critique du développement. Ce mode d'exposition semble être déterminant.

2) Mode, dose et période d'exposition

a) Mode d'exposition

L'exposition aux pesticides peut se produire directement dans le cadre de leur fabrication ou de leur utilisation professionnelle ou domestique, mais aussi indirectement par l'air, le contact de surfaces contaminées ou la consommation des eaux et denrées alimentaires. Selon les circonstances, ce sont soit la population professionnellement exposée, soit la population générale qui sera concernée.

Qu'il s'agisse d'expositions professionnelles ou environnementales, les substances pénètrent dans l'organisme selon trois voies : la voie cutanée, la voie digestive (ou orale) et la voie respiratoire.

L'exposition aux pesticides par inhalation concerne plus particulièrement certaines conditions spécifiques, comme la fumigation, la préparation ou l'application dans les milieux fermés. Pour la population générale, la voie respiratoire est souvent considérée comme la voie d'exposition la plus importante à cause notamment de la pollution de l'air, mais elles sont relativement peu étudiées par rapport aux contaminations par voie orale (contamination des eaux ou des aliments).

L'exposition à proximité des lieux d'épandage est considérée comme non négligeable. L'analyse de l'ensemble des mesures réalisées par les Associations

agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA) au début des années 2000 a montré une importante saisonnalité de la présence de pesticides dans l'air (plus forte pendant les périodes de traitements des cultures). L'utilisation de pesticides à domicile apparaît également comme une source possible d'exposition par voie respiratoire, notamment les formes aérosols, pulvérisées, ainsi que les poudres.

Notre modèle d'exposition prend en compte l'importance de cette voie d'où notre traitement par voie nasale pour mimer l'exposition des agriculteurs et des personnes vivant à proximité des lieux de cultures intensives. L'exposition par voie nasale est d'autant plus importante pour l'étude de la neurotoxicité du GLA car la voie nasale constitue une porte d'entrée directe dans le cerveau via l'épithélium olfactif sans passer par la BHE (Hanson and Frey, 2008).

Le transport direct du nez vers le cerveau à travers les terminaisons neuronales olfactives (Balin et al., 1986; Thorne et al., 1995; Thorne et al., 2004) après le dépôt par voie intra-nasale et l'absorption sur l'épithélium olfactif (Djupestrand et al., 2006) fournit un moyen non invasif pour contourner la BHE dans le cadre d'administration de médicaments (Pardridge, 1998). Néanmoins, cette voie peut inoculer d'autres substances présentes dans l'air et notamment des pesticides.

Il existe deux principaux moyens pouvant transporter les substances via les terminaisons nerveuses olfactives (figure 25) : le transport intracellulaire et le transport extracellulaire. Le transport intracellulaire à partir d'un dépôt sur l'épithélium olfactif se produit par l'absorption de ce dernier par les neurones sensoriels olfactifs par endocytose (Thorne et al., 1995). Le transport extracellulaire, favorisant les molécules hydrophiles avec plus grand poids moléculaire, se produit par diffusion paracellulaire à la fois au niveau de l'épithélium olfactif et dans les voies respiratoires (Balin et al., 1986). Dans le cas des fibres nerveuses olfactives, le transport extracellulaire a lieu dans un canal continu partant de l'épithélium olfactif vers le bulbe olfactif. Ce canal est formé par les cellules environnantes qui entourent les fibres nerveuses olfactives (Li et al., 2005).

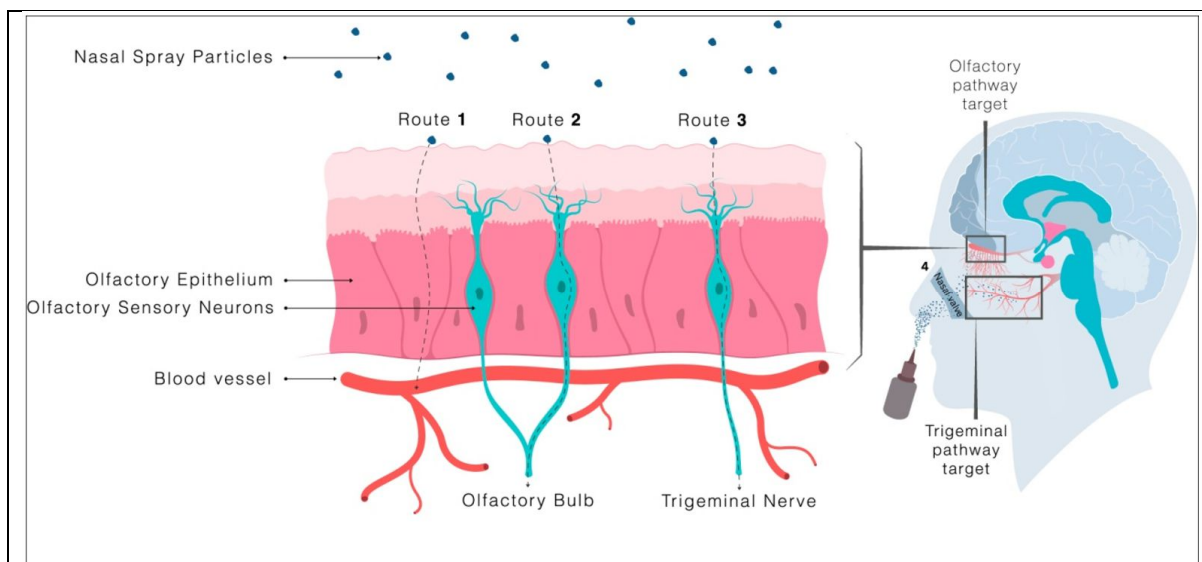


Figure 25 : Le transport des agents administrés par voie intranasale pour le système nerveux central

Les agents psychopharmacologiques administrés par voie intranasale peuvent atteindre des destinations centrales indirectement via l'absorption capillaire sanguine (1), ou directement par l'intermédiaire des terminaisons neuronales olfactives (2) ou par la route de fibres nerveuses trigéminales (3). D'après (Quintana et al., 2016).

b) Dose d'exposition

L'administration par la voie intranasale fournit beaucoup d'avantages dans le cadre d'administration de médicaments, notamment la rapidité pour que les substances atteignent le cerveau et pour leur biodisponibilité. Mais une exposition par un pesticide tel que le GLA, même à de très faibles doses, peut avoir des conséquences désastreuses sur la santé. La question sur la fiabilité des doses journalières acceptables (DJA) ou doses minimales sans effet néfaste (NOAEL) du GLA est légitime. La NOAEL du GLA calculé pour la souris est 11 mg/kg/jour (Meyer, 1991). Or, dans notre étude, nous avons utilisé des doses nettement inférieures (0.2 mg/kg et 1 mg/kg trois fois par semaine seulement) mais causant des perturbations importantes au niveau du SNC. La fiabilité de cette NOAEL peut être remise en cause car elle dépend de beaucoup de paramètres comme les protocoles expérimentaux choisis, le nombre d'individus utilisés, ou de la variabilité de la réponse biologique des animaux en fonction de l'âge ou du sexe par exemple. Les données toxicologiques obtenues sur l'animal de laboratoire ne peuvent pas servir directement à protéger l'homme. Elles nécessitent une extrapolation en les corrigeant par des facteurs d'incertitude ou de sécurité beaucoup plus important de ce que l'on fait à

l'heure actuelle, et tenir compte à la fois de la différence de sensibilité de l'homme par rapport à l'animal. Ce facteur d'incertitudes est de 1×1000 pour les composés potentiellement cancérogènes, et il est de 1×100 pour le reste des composés.

c) Période d'exposition

Les conséquences de l'exposition au GLA sont d'autant plus importantes quand elle se fait durant la gestation et l'allaitement, deux périodes cruciales dans le développement. Les effets potentiels des pesticides sur le fœtus et les nourrissons sont particulièrement préoccupants, car ces pesticides traversent le placenta, et sont retrouvés dans le lait maternel pendant l'allaitement (Perera et al., 2005). Pendant la gestation, le placenta joue un rôle majeur dans la nutrition et la croissance de l'embryon, dans la régulation des fonctions endocriniennes et la biotransformation des médicaments (Gude et al., 2004; Haggarty et al., 2002; Sastry, 1999). Les échanges impliquent, non seulement, les constituants physiologiques, mais aussi des substances présentant un risque pathologique pour le fœtus comme les xénobiotiques tels que les médicaments, les additifs alimentaires, les pesticides et les polluants de l'environnement (Myllynen et al., 2005). Aris et Leblanc ont démontré par dosage la présence du GLA de l'ordre de 30 ng / ml de sérum dans une cohorte de 39 femmes non enceintes (Aris and Leblanc, 2011). La forme GLA n'est pas détectable chez les femmes enceintes, en revanche, le 3-MPPA, l'un des métabolites du GLA est présent chez les mères et dans les cordons ombilicaux des fœtus (Aris and Leblanc, 2011). L'étude des effets du pesticide est importante mais les connaissances de sa métabolisation et les effets de ses métabolites sont plus que nécessaires dans la compréhension du mode d'action du glufosinate d'ammonium.

Conclusion Générale & Perspectives

Conclusion générale

Mes travaux de thèse ont permis l'étude de plusieurs aspects sur le développement cérébral d'une exposition à de très faibles doses au glufosinate d'ammonium durant la période périnatale par l'utilisation d'un modèle murin. Deux faibles doses sont utilisées pour cette étude (0.2 et 1 mg/kg/3 fois par semaine par voie intranasal). Dans une première partie, notre problématique concernait la question de la neurogenèse et du comportement migratoire des neuroblastes.

Ce processus très actif est responsable de la production des nouveaux neurones dans le cerveau. Cette production se situe dans la SVZ formant la paroi des ventricules latéraux. Les neuroblastes néoformés migrent via le RMS vers les BO. La neurogenèse est très impliquée dans les processus olfactifs et notamment dans le comportement social de la souris. Nous avons pu mettre en évidence, chez les souris exposées en périnatal au GLA, une altération de l'aspect général de la neurogenèse au niveau de la SVZ et du comportement migratoire de ces cellules qui, normalement, migrent d'une façon très particulière et spécifique. En effet les neuroblastes migrent en chaînes avec un mouvement saltatoire et dans une direction bien déterminée. La production de nouveaux neurones est diminuée chez les GLA0.2. La migration des neuroblastes est retardée dans les deux conditions.

En effet, on observe une accumulation des neuroblastes au niveau de la SVZ chez les GLA0.2 et des migrations ectopiques chez les GLA1. Dans les deux cas, les neuroblastes ont du mal à atteindre les BO. Des mécanismes de compensations se sont mis en place comme la surexpression de la Reelin et la diminution de l'apoptose au niveau des bulbes olfactifs pour pallier au manque de neuroblastes qui atteignent les bulbes olfactifs. Pour mieux comprendre ce phénomène, il serait intéressant d'étudier les paramètres dynamiques de cette migration par vidéo-microscopie, notamment les aspects de vitesse, de saltation et de contacts cellules-cellules.

En deuxième lieu, nous avons effectué une analyse globale du transcriptome au niveau cérébral pour une analyse plus fine des voies de signalisations dérégulées. L'une des voies fortement dérégulées est la voie de la régulation du cytosquelette. Les données obtenues suite à l'analyse transcriptomique soulignent l'effet du GLA sur le cytosquelette et la migration cellulaire.

Les cibles du GLA chez la souris sont inconnues, mais étant donné l'analogie structurale du GLA avec le glutamate, tous les systèmes utilisant le glutamate sont donc des cibles potentielles. Au niveau du cytosquelette, le glutamate intervient dans la stabilité des microtubules via le phénomène de polyglutamylation. La seconde partie de notre travail est basée sur l'étude des effets du glufosinate d'ammonium au niveau du cytosquelette. Pour ce faire, nous avons choisi un modèle cellulaire. Nos résultats montrent des perturbations au niveau de la polyglutamylation, des blocages de la différenciation cellulaire et des ralentissements de la croissance cellulaire. Ces perturbations pourraient donc être à l'origine des problèmes de migration des neuroblastes observés au niveau de la SVZ.

Il a été déjà montré par Wei et ses collaborateurs qu'une perturbation des mécanismes de prolifération de la SVZ à un âge précoce, chez la souris, provoquait des troubles de l'anxiété, de mémoire et une incapacité à interagir avec d'autres congénères à l'âge adulte (Wei et al., 2011). Cette étude nous a poussés à nous interroger sur les conséquences comportementales d'une telle exposition au GLA pendant les phases précoces du développement. Dans la dernière partie de la thèse, nos travaux se sont focalisés sur l'analyse comportementale. Une batterie de tests comportementaux est réalisée sur la progéniture pendant les premiers jours après leur naissance et l'âge adulte. Nos résultats montrent des effets délétères de l'exposition maternelle au GLA sur le développement des premiers réflexes sensori-moteurs, de la vocalisation ultrasonique dans les premiers jours de développement et des altérations des comportements affiliatifs et olfactifs à l'âge adulte. La réactivité émotionnelle et la mémoire émotionnelle sont restées inchangées. Ces altérations comportementales ont montré une ressemblance avec les altérations comportementales observées dans des modèles animaux des troubles du spectre autistique.

Nous pouvons dire donc que l'exposition périnatale au GLA induit des changements au niveau cellulaire avec des conséquences au niveau comportemental et provoque des troubles du développement importants notamment des troubles du spectre autistique. Plusieurs études mettent en garde sur les dangers des pesticides. Les femmes enceintes, vivant à proximité des espaces où les pesticides sont appliqués, semblent présenter un risque accru d'avoir des enfants avec des traits autistiques. L'autisme est une perturbation du développement du cerveau avec une

incidence économique très importante à la charge de la société, il est donc indispensable de comprendre les causes environnementales de ce type de maladies et essayer de limiter l'impact et l'exposition des populations à des produits tel que le glufosinate d'ammonium.

Perspectives

Nous avons démontré dans cette étude que l'exposition au GLA en périnatal provoque des troubles du comportement et des problèmes au niveau de la neurogenèse et de la migration des neuroblastes de la SVZ vers les BO. Ce phénomène de neurogenèse est aussi présent au niveau de l'hippocampe. Il est donc nécessaire d'approfondir les recherches dans cet axe-là, et de découvrir si l'effet du GLA est seulement au niveau de la SVZ ou s'il est généralisé à tous ces systèmes. Le circuit olfactif est complexe. En effet, des projections axonales sortent des cellules mitrales des BO et finissent dans le noyau olfactif. Les connexions réémises vont vers le cortex limbique et l'hippocampe. On comprend ainsi le rôle de l'olfaction dans beaucoup de comportement comme la mémoire, l'émotion, l'humeur...

Des études précédentes ont mis en évidence des effets inhibiteurs du GLA sur la GS *in vitro* ou quand il est ajouté directement dans des homogénats de cerveau, mais cet effet inhibiteur n'est pas retrouvé au niveau cérébral chez des animaux traités par la voie intrapéritonéale. Dans ce cas-là, il serait intéressant de bien approfondir les études afin de définir plus précisément les cibles du GLA (canaux ioniques, transporteurs, ...) et de comprendre son mode d'action au niveau cérébral et dans d'autres organes des animaux exposés.

A l'heure actuelle, plusieurs cibles potentielles sont incriminées. Tous les systèmes utilisant le glutamate sont fragiles vis-à-vis d'une exposition au glufosinate d'ammonium. En effet le système glutamatergique (glutamine synthétase, récepteurs ionotropiques et métabotropiques) n'est pas exclusivement localisé dans le système nerveux mais est également présent dans différents organes comme le pancréas, les reins, les poumons et les cellules immunitaires.

Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté que l'exposition aux pesticides est associée à des maladies respiratoires et des perturbations du système immunitaire (Amaral, 2014; Henneberger et al., 2014). Des études immuno-toxicologiques sont en

cours dans notre laboratoire sur cet aspect-là. Les résultats préliminaires montrent une augmentation des niveaux de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le recrutement de neutrophiles et de lymphocytes dans les poumons.

Une fois dans l'organisme, le GLA peut être métabolisé. Il serait donc également nécessaire d'identifier les mécanismes de métabolisation et les différents métabolites qui peuvent aussi avoir des effets délétères sur la santé. Des études préliminaires sont conduites dans notre laboratoire et il semble que seul le PPTO (le premier métabolite issu de la dégradation du GLA) induise des crises d'épilepsie et son activité est plus importante que le produit initial.

Notre modèle d'exposition par voie intranasale est un modèle très intéressant, car il mime l'exposition répétée des personnes à proximité des champs de cultures traités aux pesticides. L'exposition par voie intranasale est une voie qui peut s'affranchir de la barrière hématoencéphalique (BHE) pour atteindre le cerveau mais les voies respiratoires sont aussi pleinement exposées. Notre étude montre un effet neurotoxique qui peut conduire à des troubles du spectre autistique mais il ne faut pas négliger les autres effets potentiels de cette molécule, que ce soit au niveau cérébral, respiratoire ou digestif (dans les cas d'une exposition par voie orale) qui restent encore à étudier.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques.

- Abal, M., Keryer, G., and Bornens, M. (2005). Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 97, 425-434.
- Abrous, D.N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews* 85, 523-569.
- Ahrens, W.H. (1994). *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*. 7th ed. Champaign, IL: Weed Science Society of America, p. 148.
- Alberti, S., Krause, S.M., Kretz, O., Philippar, U., Lemberger, T., Casanova, E., Wiebel, F.F., Schwarz, H., Frotscher, M., Schutz, G., *et al.* (2005). Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6148-6153.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and P., W. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York : Garland Science ; ISBN-10: 0-8153-3218-1.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 137, 433-457.
- Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124, 319-335.
- Altman, J., and Das, G.D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *The Journal of comparative neurology* 126, 337-389.
- Alvarez-Buylla, A. (1992). Neurogenesis and plasticity in the CNS of adult birds. *Experimental neurology* 115, 110-114.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature reviews Neuroscience* 2, 287-293.
- Amalric, M. (2015). Targeting metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in Parkinson's disease. *Current Opinion in Pharmacology* 20, 29-34.
- Amaral, A.F. (2014). Pesticides and asthma: challenges for epidemiology. *Frontiers in public health* 2, 6.
- Amaral, D.G., Schumann, C.M., and Nordahl, C.W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends in neurosciences* 31, 137-145.
- American-Psychiatric-Association (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV-TR*. 4th Edn Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32, 1-14.
- Anderson, H.A., and Wolff, M.S. (2000). Environmental contaminants in human milk. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 10, 755-760.

- Anderson, M.L., Nokia, M.S., Govindaraju, K.P., and Shors, T.J. (2012). Moderate drinking? Alcohol consumption significantly decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Neuroscience* 224, 202-209.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278, 474-476.
- Andrade, N., Komnenovic, V., Blake, S.M., Jossin, Y., Howell, B., Goffinet, A., Schneider, W.J., and Nimpf, J. (2007). ApoER2/VLDL receptor and *Dab1* in the rostral migratory stream function in postnatal neuronal migration independently of *Reelin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 8508-8513.
- Anitha, A., Nakamura, K., Yamada, K., Suda, S., Thanseem, I., Tsujii, M., Iwayama, Y., Hattori, E., Toyota, T., Miyachi, T., *et al.* (2008). Genetic analyses of roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B, 1019-1027.
- Anton, E.S., Ghashghaei, H.T., Weber, J.L., McCann, C., Fischer, T.M., Cheung, I.D., Gassmann, M., Messing, A., Klein, R., Schwab, M.H., *et al.* (2004). Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nature neuroscience* 7, 1319-1328.
- Aris, A., and Leblanc, S. (2011). Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reproductive toxicology* 31, 528-533.
- Arola, L., Palou, A., Remesar, X., and Alemany, M. (1981). Glutamine synthetase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 13, 199-202.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature medicine* 8, 963-970.
- Ascherio, A., Chen, H., Weisskopf, M.G., O'Reilly, E., McCullough, M.L., Calle, E.E., Schwarzschild, M.A., and Thun, M.J. (2006). Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of neurology* 60, 197-203.
- Aspelin, P. (1998). [Hazards of health care--for patient and community]. *Lakartidningen* 95, 484-485.
- Attwell, D. (2000). Brain uptake of glutamate: food for thought. *The Journal of nutrition* 130, 1023S-1025S.
- Audebert, S., Koulakoff, A., Berwald-Netter, Y., Gros, F., Denoulet, P., and Edde, B. (1994). Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *Journal of cell science* 107 (Pt 8), 2313-2322.
- Ayala, R., Zhang, C., Yang, D., Hwang, Y., Aung, A., Shroff, S.S., Arce, F.T., Lal, R., Arya, G., and Varghese, S. (2011). Engineering the cell-material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. *Biomaterials* 32, 3700-3711.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., and Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychological medicine* 25, 63-77.
- Bak, L.K., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry* 98, 641-653.
- Baldi, I., Gruber, A., Rondeau, V., Lebailly, P., Brochard, P., and Fabrigoule, C. (2011). Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study. *Occupational and environmental medicine* 68, 108-115.

Baldi, I., Lebailly, P., Mohammed-Brahim, B., Letenneur, L., Dartigues, J.F., and Brochard, P. (2003). Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. *American journal of epidemiology* 157, 409-414.

Balin, B.J., Broadwell, R.D., Salzman, M., and el-Kalliny, M. (1986). Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *The Journal of comparative neurology* 251, 260-280.

Barouki, R., Gluckman, P.D., Grandjean, P., Hanson, M., and Heindel, J.J. (2012). Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source* 11, 42.

Bedard, A., and Parent, A. (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain research Developmental brain research* 151, 159-168.

Belluzzi, O., Benedusi, M., Ackman, J., and LoTurco, J.J. (2003). Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 10411-10418.

Belvindrah, R., Rougon, G., and Chazal, G. (2002). Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 3594-3607.

Berg, A.T., Plioplys, S., and Tuchman, R. (2011). Risk and correlates of autism spectrum disorder in children with epilepsy: a community-based study. *Journal of child neurology* 26, 540-547.

Bobinnec, Y. (1998a). Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J Cell Biol* 143, 1575-1589.

Bobinnec, Y. (1998b). Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 223-232.

Bobinnec, Y., Moudjou, M., Fouquet, J.P., Desbruyeres, E., Edde, B., and Bornens, M. (1998). Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells. *Cell motility and the cytoskeleton* 39, 223-232.

Bolteus, A.J., and Bordey, A. (2004). GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24, 7623-7631.

Bouchard, M.F., Bellinger, D.C., Wright, R.O., and Weisskopf, M.G. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics* 125, e1270-1277.

Bouchard, M.F., Chevrier, J., Harley, K.G., Kogut, K., Vedar, M., Calderon, N., Trujillo, C., Johnson, C., Bradman, A., Barr, D.B., *et al.* (2011). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environmental health perspectives* 119, 1189-1195.

Bozoyan, L., Khachatryan, J., and Saghatelian, A. (2012). Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 1687-1704.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* 24, 197-211.

Brants, J., Semchenko, K., Wasylyk, C., Robert, A., Carles, A., Zambrano, A., Pradeau-Aubret, K., Birck, C., Schalken, J.A., Poch, O., *et al.* (2012). Tubulin tyrosine ligase like 12, a TTL family member with SET- and TTL-like domains and roles in histone and tubulin modifications and mitosis. *PloS one* 7, e51258.

Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M.R., 3rd, and Saghatelian, A. (2009). Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the

execution of selected olfactory behaviors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 15245-15257.

Bretveld, R.W., Thomas, C.M., Scheepers, P.T., Zielhuis, G.A., and Roeleveld, N. (2006). Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 4, 30.

Buchel, K.H. (1983). *Chemistry of Pesticides*. John Wiley & Sons, INC New York, USA.

Buonomano, D.V., and Merzenich, M.M. (1998). Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annual review of neuroscience* 21, 149-186.

Calaora, V., Chazal, G., Nielsen, P.J., Rougon, G., and Moreau, H. (1996). mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* 73, 581-594.

Calas, A.G., Perche, O., Richard, O., Perche, A., Paris, A., Lauga, F., Herzine, A., Palomo, J., Ardourel, M.Y., Menuet, A., *et al.* (2016). Characterization of seizures induced by acute exposure to an organophosphate herbicide, glufosinate-ammonium. *Neuroreport*.

Calas, A.G., Richard, O., Meme, S., Beloeil, J.C., Doan, B.T., Gefflaut, T., Meme, W., Crusio, W.E., Pichon, J., and Montecot, C. (2008). Chronic exposure to glufosinate-ammonium induces spatial memory impairments, hippocampal MRI modifications and glutamine synthetase activation in mice. *Neurotoxicology* 29, 740-747.

Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875.

Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., and Lledo, P.M. (2003). Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature neuroscience* 6, 507-518.

Cartmell, J., and Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *Journal of neurochemistry* 75, 889-907.

Cattani, D., de Liz Oliveira Cavalli, V.L., Heinz Rieg, C.E., Domingues, J.T., Dal-Cim, T., Tasca, C.I., Mena Barreto Silva, F.R., and Zamoner, A. (2014). Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* 320, 34-45.

Chazal, G., Durbec, P., Jankovski, A., Rougon, G., and Cremer, H. (2000). Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse. *J Neurosci* 20, 1446-1457.

Chen, Y., Beffert, U., Ertunc, M., Tang, T.S., Kavalali, E.T., Bezprozvanny, I., and Herz, J. (2005). Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 8209-8216.

Chin-Chan, M., Navarro-Yepes, J., and Quintanilla-Vega, B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in cellular neuroscience* 9, 124.

Conover, J.C. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nature Neurosci* 3, 1091-1097.

Corsini, E., Liesivuori, J., Vergieva, T., Van Loveren, H., and Colosio, C. (2008). Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Human & experimental toxicology* 27, 671-680.

Coskun, V., and Luskin, M.B. (2002). Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. *Journal of neuroscience research* 69, 795-802.

Costa, L.G. (2015). The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handbook of clinical neurology* 131, 135-148.

Cuzon, V.C., Yeh, P.W., Cheng, Q., and Yeh, H.H. (2006). Ambient GABA promotes cortical entry of tangentially migrating cells derived from the medial ganglionic eminence. *Cerebral cortex* (New York, NY : 1991) 16, 1377-1388.

Davy, A., and Robbins, S.M. (2000). Ephrin-A5 modulates cell adhesion and morphology in an integrin-dependent manner. *EMBO J* 19, 5396-5405.

de Chevigny, A. (2006). Delayed onset of odor detection in neonatal mice lacking tenascin-C. *Mol Cell Neurosci* 32, 174-186.

Di Giorgi-Gerevini, V., Melchiorri, D., Battaglia, G., Ricci-Vitiani, L., Ciceroni, C., Busceti, C.L., Biagioni, F., Iacovelli, L., Canudas, A.M., Parati, E., *et al.* (2005). Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell death and differentiation* 12, 1124-1133.

Di Giorgi Gerevini, V.D., Caruso, A., Cappuccio, I., Ricci Vitiani, L., Romeo, S., Della Rocca, C., Gradini, R., Melchiorri, D., and Nicoletti, F. (2004). The mGlu5 metabotropic glutamate receptor is expressed in zones of active neurogenesis of the embryonic and postnatal brain. *Brain research Developmental brain research* 150, 17-22.

Ding, Q., Gladson, C.L., Guidry, C.R., Santoro, S.A., Dickeson, S.K., Shin, J.T., and Thompson, J.A. (2000). Extracellular FGF-1 inhibits cytoskeletal organization and promotes fibroblast motility. *Growth factors* (Chur, Switzerland) 18, 93-107.

Djupesland, P.G., Skretting, A., Winderen, M., and Holand, T. (2006). Breath actuated device improves delivery to target sites beyond the nasal valve. *The Laryngoscope* 116, 466-472.

Doetsch, F., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14895-14900.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 5046-5061.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021-1034.

Dulac, C., and Torello, A.T. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature reviews Neuroscience* 4, 551-562.

Ecobichon, D.J. (1996). Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (Klaassen CD, Doull J, eds). 5th ed. New York:MacMillan, 643-689.

Edde, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyeres, E., Gros, F., and Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247, 83-85.

Eddleston, M., and Phillips, M.R. (2004). Self poisoning with pesticides. *BMJ (Clinical research ed)* 328, 42-44.

EFSA (2005). Summary of the EFSA Scientific Report (2005) 27,1-81. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glufosinate. European Food Safety Authority. <http://www.efsa.europa.eu/en/science/praper/conclusions/895.html>/Accessed09/01/07.

Emsley, J.G., and Hagg, T. (2003). $\alpha 6 \beta 1$ integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol* 183, 273-285.

Engel, S.M., Berkowitz, G.S., Barr, D.B., Teitelbaum, S.L., Siskind, J., Meisel, S.J., Wetmur, J.G., and Wolff, M.S. (2007). Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *American journal of epidemiology* 165, 1397-1404.

Enwere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., and Weiss, S. (2004). Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 8354-8365.

EPA, U. (2007). U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (August 30, 2007), Pesticides: Health and Safety. National Assessment of the Worker Protection Workshop #3.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* 4, 1313-1317.

Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Fenster, L., Johnson, C., Barr, D.B., and Jewell, N.P. (2006). In utero exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and neurodevelopment among young Mexican American children. *Pediatrics* 118, 233-241.

Eskenazi, B., Marks, A.R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D.B., Johnson, C., Morga, N., and Jewell, N.P. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environmental health perspectives* 115, 792-798.

Fatemi, S.H. (2005). Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 71, 179-187.

Fatemi, S.H., Stary, J.M., Halt, A.R., and Realmuto, G.R. (2001). Dysregulation of Reelin and Bcl-2 proteins in autistic cerebellum. *Journal of autism and developmental disorders* 31, 529-535.

Figa-Talamanca, I., Traina, M.E., and Urbani, E. (2001). Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occupational medicine (Oxford, England)* 51, 174-188.

Fiske, B.K., and Brunjes, P.C. (2001). NMDA receptor regulation of cell death in the rat olfactory bulb. *Journal of neurobiology* 47, 223-232.

Fleming, K., Kim, S.H., Doo, M., Maguire, G., and Potkin, S.G. (2003). Memory for emotional stimuli in patients with Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* 18, 340-342.

Frederiksen, K., and McKay, R.D. (1988). Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8, 1144-1151.

Freunscht, I., Popp, B., Blank, R., Ende, S., Moog, U., Petri, H., Prott, E.C., Reis, A., Rubo, J., Zabel, B., *et al.* (2013). Behavioral phenotype in five individuals with de novo mutations within the GRIN2B gene. *Behavioral and brain functions : BBF* 9, 20.

Fujii, T. (1997). Transgenerational effects of maternal exposure to chemicals on the functional development of the brain in the offspring. *Cancer causes & control : CCC* 8, 524-528.

Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Edde, B., Desbruyeres, E., Paturle-Lafanechere, L., Multigner, L., Job, D., and Cibert, C. (1996). The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility. *Journal of cell science* 109 (Pt 6), 1545-1553.

Garcion, E., Halilagic, A., Faissner, A., and French-Constant, C. (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423-3432.

Ghashghaei, H.T., Lai, C., and Anton, E.S. (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nature reviews Neuroscience* 8, 141-151.

Gilden, R.C., Huffling, K., and Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of obstetric, gynecologic, and neonatal nursing : JOGNN / NAACOG* 39, 103-110.

Gong, S.G. (2014). Cranial neural crest: migratory cell behavior and regulatory networks. *Experimental cell research* 325, 90-95.

Gould, E., Reeves, A.J., Graziano, M.S., and Gross, C.G. (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286, 548-552.

gouv.canada (2015). Culture d'OGM, tolérances aux herbicides.(http://www.ogm.gouv.qc.ca/utilisation_actuelle/tolerance_herbicides/tolerance.html).

Grandjean, P., Harari, R., Barr, D.B., and Debes, F. (2006). Pesticide exposure and stunting as independent predictors of neurobehavioral deficits in Ecuadorian school children. *Pediatrics* 117, e546-556.

Gratzner, H.G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 474-475.

Groc, L., Choquet, D., Stephenson, F.A., Verrier, D., Manzoni, O.J., and Chavis, P. (2007). NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 10165-10175.

Grunewald, M., Avraham, I., Dor, Y., Bachar-Lustig, E., Itin, A., Jung, S., Chimenti, S., Landsman, L., Abramovitch, R., and Keshet, E. (2006). VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175-189.

Gude, N.M., Roberts, C.T., Kalionis, B., and King, R.G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis research* 114, 397-407.

Guillette, E.A., Meza, M.M., Aquilar, M.G., Soto, A.D., and Garcia, I.E. (1998). An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. *Environmental health perspectives* 106, 347-353.

Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., and Cremer, H. (2002). Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature Neurosci* 5, 939-945.

Hack, M.A., Saghatelian, A., de Chevigny, A., Pfeifer, A., Ashery-Padan, R., Lledo, P.M., and Gotz, M. (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature neuroscience* 8, 865-872.

Hack, R., Ebert, E., Ehling, G., and Leist, K.H. (1994). Glufosinate ammonium--some aspects of its mode of action in mammals. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 32, 461-470.

Haggarty, P., Allstaff, S., Hoad, G., Ashton, J., and Abramovich, D.R. (2002). Placental nutrient transfer capacity and fetal growth. *Placenta* 23, 86-92.

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., *et al.* (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry* 68, 1095-1102.

Hanson, L.R., and Frey, W.H., 2nd (2008). Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC neuroscience* 9 *Suppl* 3, S5.

Hebb, A.L., Zacharko, R.M., Gauthier, M., Trudel, F., Laforest, S., and Drolet, G. (2004). Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice. *The European journal of neuroscience* 20, 2415-2429.

Henneberger, P.K., Liang, X., London, S.J., Umbach, D.M., Sandler, D.P., and Hoppin, J.A. (2014). Exacerbation of symptoms in agricultural pesticide applicators with asthma. *International archives of occupational and environmental health* 87, 423-432.

Hérouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis, R.-J., and Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41, 134-149.

Herouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis, R.J., and Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 41, 134-149.

Herz, J., and Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* 7, 850-859.

Hippenmeyer, S. (2014). Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Advances in experimental medicine and biology* 800, 1-24.

Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* 17, 31-108.

HSD (2003). Glufosinate-ammonium. Hazardous Substances Databank. United States National Library of Medicine. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/.temp/~87maWG:1>. Accessed 10/01/07.

Hu, H., and Rutishauser, U. (1996). A septum-derived chemorepulsive factor for migrating olfactory interneuron precursors. *Neuron* 16, 933-940.

Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1996). The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16, 735-743.

Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391-402.

Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., *et al.* (2007). Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3213-3218.

Ikegami, K., Mukai, M., Tsuchida, J., Heier, R.L., Macgregor, G.R., and Setou, M. (2006). TTLL7 is a mammalian beta-tubulin polyglutamylase required for growth of MAP2-positive neurites. *The Journal of biological chemistry* 281, 30707-30716.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008). Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience* 11, 1153-1161.

IUPAC (2007). IUPAC glossary of terms used in toxicology - terms starting with N. Environmental Health and Toxicology Specialized Information Services. U.S. Department of Health & Human Services. Retrieved February 18, 2013. based upon Duffus, J. H.; Nordberg, M.; Templeton, D. M. (2007).

"Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition (IUPAC Recommendations 2007)". Pure and Applied Chemistry 79 (7): 1153. doi:10.1351/pac200779071153.

Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. The international journal of biochemistry & cell biology 44, 847-850.

Janke, C., and Bulinski, J.C. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nature reviews Molecular cell biology 12, 773-786.

Janke, C., Rogowski, K., and van Dijk, J. (2008). Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? 'Protein Modifications: beyond the usual suspects' review series. EMBO reports 9, 636-641.

Jegou, B., Spira, A., and Jouannet, P. (1995). [Is male fertility threatened?]. Contraception, fertilité, sexualité 23, 513-515.

Jeong, S.H., Kim, B.Y., Kang, H.G., Ku, H.O., and Cho, J.H. (2006). Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations. Toxicology 220, 189-202.

Jeong, T.O., Yoon, J.C., Lee, J.B., Jin, Y.H., and Hwang, S.B. (2015). Reversible Splenic Lesion Syndrome (RESLES) Following Glufosinate Ammonium Poisoning. Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging 25, 1050-1052.

Jiao, J., and Chen, D.F. (2008). Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. Stem cells 26, 1221-1230.

Jossin, Y., and Cooper, J.A. (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. Nature neuroscience 14, 697-703.

Juliano, R.L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. Annu Rev Pharmacol Toxicol 42, 283-323.

Jurewicz, J., and Hanke, W. (2008). Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: review of epidemiological studies. International journal of occupational medicine and environmental health 21, 121-132.

Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., *et al.* (2010). New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. Neuron 67, 213-223.

Kawauchi, T., and Hoshino, M. (2008). Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. Developmental neuroscience 30, 36-46.

Keller, F., and Persico, A.M. (2003). The neurobiological context of autism. Molecular neurobiology 28, 1-22.

Kelsch, W., Lin, C.W., and Lois, C. (2008). Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 16803-16808.

KEMI (2002). "Draft Assessment Report (DAR) - public version. Initial risk assessment provided by the rapporteur Member state Sweden for the existing active substance Glufosinate (based on the variant glufosinate-ammonium) of the second stage of the review programme referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC."

Kim, H.M., Qu, T., Kriho, V., Lacor, P., Smalheiser, N., Pappas, G.D., Guidotti, A., Costa, E., and Sugaya, K. (2002). Reelin function in neural stem cell biology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 4020-4025.

- Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19, 2171-2180.
- Kishi, K. (1987). Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *The Journal of comparative neurology* 258, 112-124.
- Kiss, J.Z., and Rougon, G. (1997). Cell biology of polysialic acid. *Current opinion in neurobiology* 7, 640-646.
- Konishi, Y., and Setou, M. (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nature Neurosci* 12, 559-567.
- Kornack, D.R., and Rakic, P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5768-5773.
- Koshida, S. (2005). Integrin[alpha]5-dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell* 8, 587-598.
- Kotagiri, P., Chance, S.A., Szele, F.G., and Esiri, M.M. (2014). Subventricular zone cytoarchitecture changes in autism. *Developmental neurobiology* 74, 25-41.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32, 149-184.
- Kubo, T., Yanagisawa, H.A., Yagi, T., Hirono, M., and Kamiya, R. (2010). Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins. *Curr Biol* 20, 441-445.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 2027-2033.
- Kuriyama, S., and Mayor, R. (2008). Molecular analysis of neural crest migration. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 363, 1349-1362.
- Kwan, K.Y., Sestan, N., and Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139, 1535-1546.
- Lacroix, B. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* 189, 945-954.
- Lantz, S.R., Mack, C.M., Wallace, K., Key, E.F., Shafer, T.J., and Casida, J.E. (2014). Glufosinate binds N-methyl-D-aspartate receptors and increases neuronal network activity in vitro. *Neurotoxicology* 45, 38-47.
- Lapouble, E., Montecot, C., Sevestre, A., and Pichon, J. (2002). Phosphinothricin induces epileptic activity via nitric oxide production through NMDA receptor activation in adult mice. *Brain research* 957, 46-52.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Laviola, G., Adriani, W., Gaudino, C., Marino, R., and Keller, F. (2006). Paradoxical effects of prenatal acetylcholinesterase blockade on neuro-behavioral development and drug-induced stereotypies in reeler mutant mice. *Psychopharmacology* 187, 331-344.
- Law, A.K., Pencea, V., Buck, C.R., and Luskin, M.B. (1999). Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes. *Developmental biology* 216, 622-634.

Lazarini, F., Mouthon, M.A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Lamarque, S., Abrous, D.N., Boussin, F.D., and Lledo, P.M. (2009). Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PloS one* 4, e7017.

Lee, M.Y., Ju, W.K., Cha, J.H., Son, B.C., Chun, M.H., Kang, J.K., and Park, C.K. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor mRNA following transient forebrain ischemia in rats. *Neuroscience letters* 265, 107-110.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.

Leuner, B., Kozorovitskiy, Y., Gross, C.G., and Gould, E. (2007). Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17169-17173.

Levison, S.W., Chuang, C., Abramson, B.J., and Goldman, J.E. (1993). The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* 119, 611-622.

Levison, S.W., and Goldman, J.E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron* 10, 201-212.

Levy, S.E., Mandell, D.S., and Schultz, R.T. (2009). Autism. *Lancet* 374, 1627-1638.

Lewis-Mikhael, A.M., Bueno-Cavanillas, A., Ofir Guiron, T., Olmedo-Requena, R., Delgado-Rodriguez, M., and Jimenez-Moleon, J.J. (2015). Occupational exposure to pesticides and prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Occupational and environmental medicine*.

Li, Y., Field, P.M., and Raisman, G. (2005). Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia* 52, 245-251.

Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7526-7531.

Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.

Lin, D.Y., Zhang, S.Z., Block, E., and Katz, L.C. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434, 470-477.

Liu, G., and Rao, Y. (2003). Neuronal migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23, 6651-6659.

Liu, X., Bolteus, A.J., Balkin, D.M., Henschel, O., and Bordey, A. (2006). GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54, 394-410.

Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., and Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nature neuroscience* 8, 1179-1187.

Lledo, P.M., Alonso, M., and Grubb, M.S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews Neuroscience* 7, 179-193.

Lledo, P.M., and Saghatelian, A. (2005). Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends in neurosciences* 28, 248-254.

- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2074-2077.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.
- Luisier, A.C., Petitpierre, G., Ferdenzi, C., Clerc Berod, A., Giboreau, A., Rouby, C., and Bensafi, M. (2015). Odor Perception in Children with Autism Spectrum Disorder and its Relationship to Food Neophobia. *Frontiers in psychology* 6, 1830.
- Luo, J., Daniels, S.B., Lenington, J.B., Notti, R.Q., and Conover, J.C. (2006). The aging neurogenic subventricular zone. *Aging cell* 5, 139-152.
- Luo, L., and O'Leary, D.D. (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annual review of neuroscience* 28, 127-156.
- Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.
- Magiera, M.M., and Janke, C. (2014). Post-translational modifications of tubulin. *Current biology : CB* 24, R351-354.
- Malafrente, P.J., LePage, E.M., Hatanpaa, K.J., Burns, D.K., White, C.L., 3rd, and Raisanen, J. (2014). Expression of MAP 2 by haemangioblastomas: an immunohistochemical study with implications for diagnosis. *Pathology* 46, 450-451.
- Mamane, A., Raherison, C., Tessier, J.F., Baldi, I., and Bouvier, G. (2015). Environmental exposure to pesticides and respiratory health. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 24, 462-473.
- Marillat, V. (2002). Spatiotemporal expression patterns of slit and robo genes in the rat brain. *J Comp Neurol* 442, 130-155.
- Marin, O. (2003). Directional guidance of interneuron migration to the cerebral cortex relies on subcortical Slit1/2-independent repulsion and cortical attraction. *Development* 130, 1889-1901.
- Marin, O., Valdeolmillos, M., and Moya, F. (2006). Neurons in motion: same principles for different shapes? *Trends in neurosciences* 29, 655-661.
- Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J., and Pruitt, S.C. (2004). Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 1726-1733.
- Mason, H.A., Ito, S., and Corfas, G. (2001). Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21, 7654-7663.
- Masson, J., Sagne, C., Hamon, M., and El Mestikawy, S. (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacological reviews* 51, 439-464.
- Matsumura, N., Takeuchi, C., Hishikawa, K., Fujii, T., and Nakaki, T. (2001). Glufosinate ammonium induces convulsion through N-methyl-D-aspartate receptors in mice. *Neuroscience letters* 304, 123-125.
- Matuszek, G., and Talebizadeh, Z. (2009). Autism Genetic Database (AGD): a comprehensive database including autism susceptibility gene-CNVs integrated with known noncoding RNAs and fragile sites. *BMC medical genetics* 10, 102.

- Mayor, R., and Theveneau, E. (2014). The role of the non-canonical Wnt-planar cell polarity pathway in neural crest migration. *The Biochemical journal* 457, 19-26.
- McCauley, L.A., Anger, W.K., Keifer, M., Langley, R., Robson, M.G., and Rohlman, D. (2006). Studying Health Outcomes in Farmworker Populations Exposed to Pesticides. *Environmental health perspectives* 114, 953-960.
- McKenna, M.C. (2013). Glutamate pays its own way in astrocytes. *Frontiers in endocrinology* 4, 191.
- Meister, A. (2002). *Farm Chemicals Handbook 2002*. 2002 Publishing Co., 2002., p.214.
- Meister, A., Krishnaswamy, P.R., and Pamiljans, V. (1962). Mechanism of glutamic acid activation and glutamine synthesis. *Federation proceedings* 21, 1013-1022.
- Meldrum, B.S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition* 130, 1007S-1015S.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T., and Chapman, A.G. (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy research* 36, 189-204.
- Memberg, S.P., and Hall, A.K. (1995). Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. *Journal of neurobiology* 27, 26-43.
- Meme, S., Calas, A.G., Montecot, C., Richard, O., Gautier, H., Gefflaut, T., Doan, B.T., Meme, W., Pichon, J., and Beloeil, J.C. (2009). MRI characterization of structural mouse brain changes in response to chronic exposure to the glufosinate ammonium herbicide. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 111, 321-330.
- Menezes, J.R., and Luskin, M.B. (1994). Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14, 5399-5416.
- Menezes, J.R., Smith, C.M., Nelson, K.C., and Luskin, M.B. (1995). The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Molecular and cellular neurosciences* 6, 496-508.
- Metin, C., Vallee, R.B., Rakic, P., and Bhide, P.G. (2008). Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 11746-11752.
- Meyer, O. (1991). GLUFOSINATE AMMONIUM. First draft prepared by Dr. Otto Meyer, National Food Agency, Soborg, Denmark. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v91pr12.htm>.
- Mifflin, B.J., Wallsgrave, R.M., and Lea, P.J. (1981). Glutamine metabolism in higher plants. *Current topics in cellular regulation* 20, 1-43.
- Miragall, F., Kadmon, G., Faissner, A., Antonicek, H., and Schachner, M. (1990). Retention of J1/tenascin and the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the adult olfactory bulb. *Journal of neurocytology* 19, 899-914.
- Moon, J.M., and Chun, B.J. (2015). Serial ammonia measurement in patients poisoned with glufosinate ammonium herbicide. *Human & experimental toxicology*.
- Morshead, C.M., Craig, C.G., and van der Kooy, D. (1998). In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* 125, 2251-2261.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., and van der Kooy, D. (1994). Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071-1082.

- Mouret, A., Gheusi, G., Ghabellac, M.M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., and Lledo, P.M. (2008). Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 11511-11516.
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Magnuson, T.R., and Crawley, J.N. (2006). Mouse models of autism spectrum disorders: the challenge for behavioral genetics. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 142C, 40-51.
- Mullen, B.R., Khialeeva, E., Hoffman, D.B., Ghiani, C.A., and Carpenter, E.M. (2013). Decreased reelin expression and organophosphate pesticide exposure alters mouse behaviour and brain morphology. *ASN neuro* 5, e00106.
- Murase, S., and Horwitz, A.F. (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22, 3568-3579.
- Myers, R.A., Casals, F., Gauthier, J., Hamdan, F.F., Keebler, J., Boyko, A.R., Bustamante, C.D., Piton, A.M., Spiegelman, D., Henrion, E., *et al.* (2011). A population genetic approach to mapping neurological disorder genes using deep resequencing. *PLoS genetics* 7, e1001318.
- Myllynen, P., Pasanen, M., and Pelkonen, O. (2005). Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 26, 361-371.
- Nakaki, T., Mishima, A., Suzuki, E., Shintani, F., and Fujii, T. (2000). Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through N-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. *Neuroscience letters* 290, 209-212.
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M., Pithon-Curi, T.C., and Curi, R. (2003). Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell biochemistry and function* 21, 1-9.
- Ng, K.L., Li, J.D., Cheng, M.Y., Leslie, F.M., Lee, A.G., and Zhou, Q.Y. (2005). Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308, 1923-1927.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T. (2004). Multiple roles for Slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24, 1497-1506.
- Nguyen, L., Malgrange, B., Breuskin, I., Bettendorff, L., Moonen, G., Belachew, S., and Rigo, J.M. (2003). Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 3278-3294.
- Nissant, A., Bardy, C., Katagiri, H., Murray, K., and Lledo, P.M. (2009). Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nature neuroscience* 12, 728-730.
- Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry* 69, 277-302.
- Ohta, S., Hamada, M., Sato, N., and Toramoto, I. (2015). Polyglutamylated Tubulin Binding Protein C1orf96/CSAP Is Involved in Microtubule Stabilization in Mitotic Spindles. *PloS one* 10, e0142798.
- Ory, S., Munari-Silem, Y., Fort, P., and Jurdic, P. (2000). Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *Journal of cell science* 113 (Pt 7), 1177-1188.
- Pallotto, M., and Deprez, F. (2014). Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 166.
- Palmen, S.J., van Engeland, H., Hof, P.R., and Schmitz, C. (2004). Neuropathological findings in autism. *Brain : a journal of neurology* 127, 2572-2583.

Panagiotakos, G., Alshamy, G., Chan, B., Abrams, R., Greenberg, E., Saxena, A., Bradbury, M., Edgar, M., Gutin, P., and Tabar, V. (2007). Long-term impact of radiation on the stem cell and oligodendrocyte precursors in the brain. *PloS one* 2, e588.

Pardridge, W.M. (1998). CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *Journal of neurochemistry* 70, 1781-1792.

Parent, J.M. (2007). Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Progress in brain research* 163, 529-540.

Park, H.Y., Lee, P.H., Shin, D.H., and Kim, G.W. (2006). Anterograde amnesia with hippocampal lesions following glufosinate intoxication. *Neurology* 67, 914-915.

Parpura, V., Basarsky, T.A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., and Haydon, P.G. (1994). Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369, 744-747.

Parron, T., Hernandez, A.F., and Villanueva, E. (1996). Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic science international* 79, 53-63.

Pencea, V., Bingaman, K.D., Freedman, L.J., and Luskin, M.B. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental neurology* 172, 1-16.

Perera, F.P., Rauh, V., Whyatt, R.M., Tang, D., Tsai, W.Y., Bernert, J.T., Tu, Y.H., Andrews, H., Barr, D.B., Camann, D.E., *et al.* (2005). A summary of recent findings on birth outcomes and developmental effects of prenatal ETS, PAH, and pesticide exposures. *Neurotoxicology* 26, 573-587.

Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A., and Bonfanti, L. (2005). Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *The Journal of comparative neurology* 487, 407-427.

Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A., and Bonfanti, L. (1997). Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain research bulletin* 42, 9-21.

Persico, A.M., and Bourgeron, T. (2006). Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends in neurosciences* 29, 349-358.

Peteanu, L., and Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 6106-6113.

Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S., *et al.* (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* 466, 368-372.

Platel, J.C., Dave, K.A., and Bordey, A. (2008). Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *The Journal of physiology* 586, 3739-3743.

Platel, J.C., Dave, K.A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M.E., and Bordey, A. (2010a). NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65, 859-872.

Platel, J.C., Lacar, B., and Bordey, A. (2007). GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *Journal of molecular histology* 38, 602-610.

Platel, J.C., Stambouliau, S., Nguyen, I., and Bordey, A. (2010b). Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain research reviews* 63, 60-71.

Poluch, S., and Konig, N. (2002). AMPA receptor activation induces GABA release from neurons migrating tangentially in the intermediate zone of embryonic rat neocortex. *The European journal of neuroscience* *16*, 350-354.

Price, J., Turner, D., and Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *84*, 156-160.

Purves D, A.G., Fitzpatrick D, et al., (2001). editors. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. *Glutamate Receptors*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10802/>.

Qiu, S., Zhao, L.F., Korwek, K.M., and Weeber, E.J. (2006). Differential reelin-induced enhancement of NMDA and AMPA receptor activity in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *26*, 12943-12955.

Quignot, N., Barouki, R., and Lemazurier, E. (2011). Endocrine disruption and human reproduction risk assessment : today's scientific challenges and the stakes for tomorrow. *Environnement, risques & santé* *10*, 454-468.

Quintana, D.S., Guastella, A.J., Westlye, L.T., and Andreassen, O.A. (2016). The promise and pitfalls of intranasally administering psychopharmacological agents for the treatment of psychiatric disorders. *Molecular psychiatry* *21*, 29-38.

Ramon, Y., and Cajal, S. (1913). *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. London: Oxford University Press; 1913. 1928. Trans. R. M. Day, from the Spanish.

Rauh, V.A., Garfinkel, R., Perera, F.P., Andrews, H.F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whitehead, R., Tang, D., and Whyatt, R.W. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* *118*, e1845-1859.

Recio-Vega, R., Ocampo-Gomez, G., Borja-Aburto, V.H., Moran-Martinez, J., and Cebrian-Garcia, M.E. (2008). Organophosphorus pesticide exposure decreases sperm quality: association between sperm parameters and urinary pesticide levels. *Journal of applied toxicology : JAT* *28*, 674-680.

Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A., and Bre, M.H. (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* *266*, 1688-1691.

Regnard, C., Desbruyeres, E., Denoulet, P., and Edde, B. (1999). Tubulin polyglutamylase: isozymic variants and regulation during the cell cycle in HeLa cells. *Journal of cell science* *112* (Pt 23), 4281-4289.

Repetto, R., and Baliga, S.S. (1996). Pesticides and the immune system: the public health risks. Executive summary. *Central European journal of public health* *4*, 263-265.

Ribas-Fito, N., Torrent, M., Carrizo, D., Munoz-Ortiz, L., Julvez, J., Grimalt, J.O., and Sunyer, J. (2006). In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *American journal of epidemiology* *164*, 955-962.

Rice, A.C., Khaldi, A., Harvey, H.B., Salman, N.J., White, F., Fillmore, H., and Bullock, M.R. (2003). Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Experimental neurology* *183*, 406-417.

Roberts, E.M., English, P.B., Grether, J.K., Windham, G.C., Somberg, L., and Wolff, C. (2007). Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environmental health perspectives* *115*, 1482-1489.

Rogowski, K. (2009). Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation. *Cell* *137*, 1076-1087.

- Rudy, C.C., Hunsberger, H.C., Weitzner, D.S., and Reed, M.N. (2015). The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Aging and disease* 6, 131-148.
- Ruhland, M., Engelhardt, G., and Pawlizki, K. (2004). Distribution and metabolism of D/L-, L- and D-glufosinate in transgenic, glufosinate-tolerant crops of maize (*Zea mays* L ssp *mays*) and oilseed rape (*Brassica napus* L var *napus*). *Pest management science* 60, 691-696.
- Saghatelian, A., de Chevigny, A., Schachner, M., and Lledo, P.M. (2004). Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nature Neurosci* 7, 347-356.
- Salesse, R., and Gervais, R. (2012). *Odorat et goût : De la neurobiologie des sens chimiques aux applications*. éditions Quae. ISBN-13 : 978-2759217700.
- Sanborn, M., Kerr, K.J., Sanin, L.H., Cole, D.C., Bassil, K.L., and Vakil, C. (2007). Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 53, 1712-1720.
- Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., and Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *The EMBO journal* 5, 3133-3142.
- Sastry, B.V. (1999). Techniques to study human placental transport. *Advanced drug delivery reviews* 38, 17-39.
- Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., *et al.* (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629-632.
- Schlett, K. (2006). Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Current topics in medicinal chemistry* 6, 949-960.
- Schmid, R.S., Jo, R., Shelton, S., Kreidberg, J.A., and Anton, E.S. (2005). Reelin, integrin and DAB1 interactions during embryonic cerebral cortical development. *Cereb Cortex* 15, 1632-1636.
- Seki, T., and Arai, Y. (1993). Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13, 2351-2358.
- Senkov, O., Tikhobrazova, O., and Dityatev, A. (2012). PSA-NCAM: synaptic functions mediated by its interactions with proteoglycans and glutamate receptors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 591-595.
- Sheiner, E.K., Sheiner, E., Hammel, R.D., Potashnik, G., and Carel, R. (2003). Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Industrial health* 41, 55-62.
- Shelton, J.F., Geraghty, E.M., Tancredi, D.J., Delwiche, L.D., Schmidt, R.J., Ritz, B., Hansen, R.L., and Hertz-Picciotto, I. (2014). Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environmental health perspectives* 122, 1103-1109.
- Shelton, J.F., and Hertz-Picciotto, I. (2015). Neurodevelopmental disorders and agricultural pesticide exposures: Shelton and Hertz-Picciotto respond. *Environmental health perspectives* 123, A79-80.
- Simo, S., Pujadas, L., Segura, M.F., La Torre, A., Del Rio, J.A., Urena, J.M., Comella, J.X., and Soriano, E. (2007). Reelin induces the detachment of postnatal subventricular zone cells and the expression of the Egr-1 through Erk1/2 activation. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991)* 17, 294-303.
- Simuni, T., and Sethi, K. (2008). Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Annals of neurology* 64 Suppl 2, S65-80.

Sinor, A.D., Irvin, S.M., Cobbs, C.S., Chen, J., Graham, S.H., and Greenberg, D.A. (1998). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in astroglial cultures. *Brain research* 812, 289-291.

Slotnick, B. (2001). Animal cognition and the rat olfactory system. *Trends in cognitive sciences* 5, 216-222.

Small, S.A. (2003). Measuring correlates of brain metabolism with high-resolution MRI: a promising approach for diagnosing Alzheimer disease and mapping its course. *Alzheimer disease and associated disorders* 17, 154-161.

Smith, Q.R. (2000). Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *The Journal of nutrition* 130, 1016S-1022S.

Snayyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Gotz, M., Barker, P.A., *et al.* (2009). Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 4172-4188.

Solecki, D.J., Govek, E.E., Tomoda, T., and Hatten, M.E. (2006). Neuronal polarity in CNS development. *Genes Dev* 20, 2639-2647.

Solecki, D.J., Model, L., Gaetz, J., Kapoor, T.M., and Hatten, M.E. (2004). Par6[alpha] signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nature Neurosci* 7, 1195-1203.

Sommer, B., and Seeburg, P.H. (1992). Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. *Trends in pharmacological sciences* 13, 291-296.

Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.

Stewart, P.A., and Hayakawa, E.M. (1987). Interendothelial junctional changes underlie the developmental 'tightening' of the blood-brain barrier. *Brain research* 429, 271-281.

Stewart, R.R., Hoge, G.J., Zigova, T., and Luskin, M.B. (2002). Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *Journal of neurobiology* 50, 305-322.

Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., and Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 4738-4747.

Stromme, P., Mangelsdorf, M.E., Shaw, M.A., Lower, K.M., Lewis, S.M., Bruyere, H., Lutchterath, V., Gedeon, A.K., Wallace, R.H., Scheffer, I.E., *et al.* (2002). Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nature genetics* 30, 441-445.

Sudo, H., and Baas, P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J Neurosci* 30, 7215-7226.

Sui, Y., Horne, M.K., and Stanic, D. (2012). Reduced proliferation in the adult mouse subventricular zone increases survival of olfactory bulb interneurons. *PloS one* 7, e31549.

Sun, S.H., Ou, H.C., Jang, T.H., Lin, L.B., and Huang, H.M. (1997). Altered phospholipid metabolism in sodium butyrate-induced differentiation of C6 glioma cells. *Lipids* 32, 273-282.

Sun, W., Kim, H., and Moon, Y. (2010). Control of neuronal migration through rostral migration stream in mice. *Anatomy & cell biology* 43, 269-279.

Suryavanshi, S. (2010). Tubulin glutamylation regulates ciliary motility by altering inner dynein arm activity. *Curr Biol* 20, 435-440.

Swaney, W.T., and Keverne, E.B. (2009). The evolution of pheromonal communication. *Behavioural brain research* 200, 239-247.

Tada, E., Yang, C., Gobbel, G.T., Lamborn, K.R., and Fike, J.R. (1999). Long-term impairment of subependymal repopulation following damage by ionizing irradiation. *Experimental neurology* 160, 66-77.

Talkowski, M.E., Rosenfeld, J.A., Blumenthal, I., Pillalamarri, V., Chiang, C., Heilbut, A., Ernst, C., Hanscom, C., Rossin, E., Lindgren, A.M., *et al.* (2012). Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell* 149, 525-537.

Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., and Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular research* 65, 550-563.

Taupin, P., Ray, J., Fischer, W.H., Suhr, S.T., Hakansson, K., Grubb, A., and Gage, F.H. (2000). FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCG, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron* 28, 385-397.

Teixeira, C.M., Martin, E.D., Sahun, I., Masachs, N., Pujadas, L., Corvelo, A., Bosch, C., Rossi, D., Martinez, A., Maldonado, R., *et al.* (2011). Overexpression of Reelin prevents the manifestation of behavioral phenotypes related to schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36, 2395-2405.

Tejada-Simon, M.V. (2015). Modulation of actin dynamics by Rac1 to target cognitive function. *Journal of neurochemistry* 133, 767-779.

Thorne, R.G., Emory, C.R., Ala, T.A., and Frey, W.H., 2nd (1995). Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain research* 692, 278-282.

Thorne, R.G., Pronk, G.J., Padmanabhan, V., and Frey, W.H., 2nd (2004). Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127, 481-496.

Tomasiewicz, H. (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.

Tomlin, C.D.S. (1994). (ed.). *The Pesticide Manual - World Compendium*. 10th ed. Surrey, UK: The British Crop Protection Council, p. 542.

Tomlin, C.D.S. (1997). *The Pesticide Manual - World Compendium*, 11 th ed., British Crop Protection Council, Surrey, England, p. 644.

Tonacci, A., Billeci, L., Tartarisco, G., Ruta, L., Muratori, F., Pioggia, G., and Gangemi, S. (2015). Olfaction in autism spectrum disorders: A systematic review. *Child neuropsychology : a journal on normal and abnormal development in childhood and adolescence*, 1-25.

Torres-Sanchez, L., Rothenberg, S.J., Schnaas, L., Cebrian, M.E., Osorio, E., Del Carmen Hernandez, M., Garcia-Hernandez, R.M., Del Rio-Garcia, C., Wolff, M.S., and Lopez-Carrillo, L. (2007). In utero p,p'-DDE exposure and infant neurodevelopment: a perinatal cohort in Mexico. *Environmental health perspectives* 115, 435-439.

Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M., and van der Kooy, D. (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 7850-7859.

- Tsai, J.W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nature neuroscience* 10, 970-979.
- Tshala-Katumbay, D., Mwanza, J.C., Rohlman, D.S., Maestre, G., and Oria, R.B. (2015). A global perspective on the influence of environmental exposures on the nervous system. *Nature* 527, S187-192.
- Van Maele-Fabry, G., Lantin, A.C., Hoet, P., and Lison, D. (2010). Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer causes & control : CCC* 21, 787-809.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Venerosi, A., Ricceri, L., Scattoni, M.L., and Calamandrei, G. (2009). Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in CD-1 mouse pups. *Environmental health : a global access science source* 8, 12.
- Verhey, K.J., and Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152-2160.
- Wang, D.D., Krueger, D.D., and Bordey, A. (2003). GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *The Journal of physiology* 550, 785-800.
- Wang, R., Cleary, R.A., Wang, T., Li, J., and Tang, D.D. (2014). The association of cortactin with profilin-1 is critical for smooth muscle contraction. *The Journal of biological chemistry* 289, 14157-14169.
- Watanabe, T. (1997). Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture. *Neuroscience letters* 222, 17-20.
- Watanabe, T., and Iwase, T. (1996). Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 16, 287-299.
- Watanabe, T., and Sano, T. (1998). Neurological effects of glufosinate poisoning with a brief review. *Human & experimental toxicology* 17, 35-39.
- Watson, R.E., Desesso, J.M., Hurtt, M.E., and Cappon, G.D. (2006). Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology* 77, 471-484.
- Wei, L., Meaney, M.J., Duman, R.S., and Kaffman, A. (2011). Affiliative behavior requires juvenile, but not adult neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 14335-14345.
- Whitman, M.C., Fan, W., Relu, L., Rodriguez-Gil, D.J., and Greer, C.A. (2009). Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *The Journal of comparative neurology* 516, 94-104.
- Whitman, M.C., and Greer, C.A. (2007). Synaptic integration of adult-generated olfactory bulb granule cells: basal axodendritic centrifugal input precedes apical dendrodendritic local circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 9951-9961.
- Whitman, M.C., and Greer, C.A. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in neurobiology* 89, 162-175.
- WHO (1987). "Principles for the safety assessment of food additives and contaminants in food". *Environmental Health Criteria* 70.
- WHO (2012). GLUFOSINATE-AMMONIUM. First draft prepared by G. Wolterink, C.M. Mahieu and L. Davies. Evaluation of the joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR).

WHO.UNEP (1989). Public Health Impact of Pesticides used in Agriculture. OMS & PNUE, Genève, Suisse.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.

Wicker, B., Monfardini, E., and Royet, J.P. (2016). Olfactory processing in adults with autism spectrum disorders. *Molecular autism* 7, 4.

Winchester, P.D., Huskins, J., and Ying, J. (2009). Agrichemicals in surface water and birth defects in the United States. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992) 98, 664-669.

Winner, B., Cooper-Kuhn, C.M., Aigner, R., Winkler, J., and Kuhn, H.G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 16, 1681-1689.

Winner, B., Kohl, Z., and Gage, F.H. (2011). Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 33, 1139-1151.

Wong, C.T., Wais, J., and Crawford, D.A. (2015). Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing autism spectrum disorders. *The European journal of neuroscience*.

Wu, W. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.

Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1999). Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400, 331-336.

Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., and Tsai, L.H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* 114, 469-482.

Yan, J., and Jin, T. (2012). Signaling network from GPCR to the actin cytoskeleton during chemotaxis. *Bioarchitecture* 2, 15-18.

Young, C.C., Brooks, K.J., Buchan, A.M., and Szele, F.G. (2011). Cellular and molecular determinants of stroke-induced changes in subventricular zone cell migration. *Antioxidants & redox signaling* 14, 1877-1888.

Young, J.G., Eskenazi, B., Gladstone, E.A., Bradman, A., Pedersen, L., Johnson, C., Barr, D.B., Furlong, C.E., and Holland, N.T. (2005). Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology* 26, 199-209.

Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., and Chedotal, A. (2010). Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137, 1939-1952.

Yu, Y., Yang, Y., Zhao, X., Liu, X., Xue, J., Zhang, J., and Yang, A. (2015). Exposure to the mixture of organophosphorus pesticides is embryotoxic and teratogenic on gestational rats during the sensitive period. *Environmental toxicology*.

Zhang, X., Wu, M., Yao, H., Yang, Y., Cui, M., Tu, Z., Stallones, L., and Xiang, H. (2015). Pesticide poisoning and neurobehavioral function among farm workers in Jiangsu, People's Republic of China. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior*.

Zou, J., Pan, Y.W., Wang, Z., Chang, S.Y., Wang, W., Wang, X., Tournier, C., Storm, D.R., and Xia, Z. (2012). Targeted deletion of ERK5 MAP kinase in the developing nervous system impairs development of GABAergic interneurons in the main olfactory bulb and behavioral discrimination between structurally similar odorants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4118-4132.

Annexe

Annexe

Analyse transcriptomique - database « ASD : Autism Spectrum Disorder »

Méthode :

Les puces d'expression (Affymetrix Mice Exon 1.0 ST array 1.0, Affymetrix, Santa Clara, CA) sont réalisées sur les ARNs totaux extraits des cerveaux de souriceaux à PND15. Le protocole général est décrit en figure 9. Brièvement, à partir des ARNs totaux (200 ng), les ARNm sont spécifiquement rétro-transcrits en ADNc (ADN complémentaire) simple brin puis double brin. L'obtention de ces ADNc, spécifiques des ARNm, sont la matrice pour une expansion transcriptomique générale de tous les ARNm par transcription in vitro (IVT). Après 18 heures d'IVT, nous avons générés une grande quantité d'ARNc (en moyenne 1500ng/μl). Après purification sur billes magnétiques, les ARNc sont rétro-transcrits en présence de dUTP modifiés (désoxy-uracil tri-phosphate) et de dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate) pour obtenir des ADNc « marqués ». Les matrices d'ARNc sont dégradées par de la RNase H. Après une nouvelle purification sur billes magnétiques, nous obtenons une quantité suffisante d'ADNc marqués pour l'hybridation finale (5500 ng d'ADNc). Cependant, avant cette dernière étape, les ADNc sont fragmentés par deux enzymes spécifiques (UDG (Uracil DNA Glycosylase) et APE1 (Endonucléase Apurinic-Apyrimidinic humain)) puis marqués en 3' par de la biotine grâce à l'enzyme TDT (Terminal Deoxynucleotidyl Transférase). Une fois marqués les 5500 ng d'ADNc sont injectés dans la puce EXON1.0 Après hybridation pendant 16 heures à 18 heures et lavage des puces, ces dernières sont scannées par un laser argon 488 nm permettant d'obtenir les mesures de fluorescence pour chaque fragment d'ADNc.

A l'aide du logiciel Genespring X, l'intensité de fluorescence de chaque exon de chaque ARNm de départ est calculée. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la concentration (en UA) de ce fragment d'ADNc et donc à la quantité initiale (en UA) « d'expression génique ». Ce logiciel permet d'obtenir les listes de gènes significativement dérégulés entre nos échantillons Contrôles, GLA0.2 et GLA1. L'analyse statistique réalisée, et validée par la littérature, est une analyse ANOVA globale, suivie d'un test post-Hoc, et d'une correction mathématique de Benjaminin Hochberg. Dans un souci d'éviter le plus possibles les faux-positifs, une fois la liste

des gènes significativement dérégulés nous nous focalisons uniquement sur ceux dont les variations sont de plus de 20% (analyse de Fold-Change 1.2).

Dans notre étude, nous n'avons pas étudié l'ensemble des gènes de la cellule mais nous nous sommes focalisés, dans cette annexe, sur les gènes connus pour être impliqués dans les ASD. La liste de ces gènes a été obtenue sur la base de données « Autism Database » (Matuszek and Talebizadeh, 2009).

Résultats

Dans cet axe nous nous sommes intéressés à savoir si les altérations moléculaires comportementales observées après le traitement périnatal au GLA pouvaient être associées ou expliquées par la perturbation de gènes d' « autisme ».

Grâce à la base de données « Autism database » nous avons trouvé 192 gènes impliqués dans les ASD. De manière générale, 143 gènes parmi les 192 sont significativement dérégulés chez les GLA0.2 et/ou GLA1 par comparaison au groupe CTL (tableau 9). Parmi ces 143 gènes, 50 gènes (34,9 %) présentent une dérégulation de plus de 20% (1.2 FC) chez les animaux GLA0.2 et GLA1 (Tableau 9). Pour être plus précis, 9 gènes sont dérégulés entre GLA0.2 et CTL tandis que 36 gènes sont dérégulés entre GLA1 et CTL (37 gènes sont surexprimés et 36 sous-exprimés). Seuls 5 gènes sont dérégulés en commun à GLA0.2 et GLA1, avec, sauf pour 1 gène, des sens de variation différents entre GLA0.2 et GLA1 (Tableau 9).

Ces résultats montrent un effet dose de l'exposition au GLA sur le nombre de gène du cytosquelette dérégulé, mais aussi un caractère spécifique de ces dérégulations puisque, in fine, seul 1 gène est commun en dérégulation et en sens de variations. Le traitement au GLA a donc un impact fort sur les voies d'expression de « l'autisme ».

Ces résultats montrent que le traitement au GLA altère de manière significative les gènes « d'autisme ». Ainsi, il est compréhensible que nous retrouvions des anomalies comportementales comparables aux ASD.

Tableau 8 : Liste des gènes impliqués dans des pathologies ASD dérégulés par l'exposition périnatale au GLA

Transcripts Cluster Id	FC ([GLA 0.2 mg/kg] vs [CTRL])	FC ([GLA 1.0 mg/kg] vs [CTRL])	Gene Description	Gene Symbol
6929458	1.2670786	-1.8851146	dipeptidylpeptidase 6	Dpp6
6869223	1.3133395	-1.8003786	phosphatase and tensin homolog	Pten
6887327	1.2403033	-1.2305709	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha RIKEN cDNA A230059G12 gene	Scn1a A230059G12Rik
6966233	-1.4486128	1.4338192	macrophage migration inhibitory factor	Mif
6985957	-1.2150182	-1.4127473	ankyrin repeat domain 11	Ankrd11
6859935	1.1259978	-1.4049746	adenomatosis polyposis coli	Apc
6936589	1.0436352	-1.3989779	reelin	Reln
7012305	1.1742301	-1.3701109	dystrophin, muscular dystrophy	Dmd
6823284	1.1855932	-1.3612919	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	Kcnma1
6843861	1.0421512	-1.3410223	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)	Grin2a
6858134	1.0787467	-1.3310672	neurexin I	Nrxn1
6903711	1.0363065	-1.3052648	neuroligin 1	Nlgn1
6783337	1.1004288	-1.3031278	benzodiazepine receptor associated protein 1	Bzrap1
6794766	1.0530518	-1.3024753	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	Nrcam
6922382	1.0210165	-1.2860717	astrotactin 2	Astn2
6801395	1.0578177	-1.2761389	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2	Mdga2
6774659	1.0364871	-1.2681154	receptor accessory protein 3	Reep3
6974220	-1.017473	-1.262152	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	Dlgap2
6782776	1.1193842	-1.2605711	neurofibromatosis 1	Nf1
6960931	1.07119	-1.2357483	ubiquitin protein ligase E3A	Ube3a
6829591	-1.0881605	-1.2252938	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	Sema5a
6749911	-1.0417604	-1.2106038	neuropilin 2	Nrp2
6764138	-1.1226331	-1.2049912	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	Atp1a2
6869013	-1.0356289	-1.203936	solute carrier family 1 (neuronal/epithelial high affinity glutamate transporter, system Xag), member 1 RIKEN cDNA 4430402I18 gene	Slc1a1 4430402I18Rik
7014982	-1.2804899	-1.1249604	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	Ap1s2
7012862	-1.2452599	-1.06373	neuroligin 3	Nlgn3
6941374	-1.2039977	1.0332973	heat shock protein 8	Hspb8
6887450	-1.2663231	1.0722457	serine/threonine kinase 39, STE20/SPS1 homolog (yeast)	Stk39
6777176	-1.4918879	1.1098784	tryptophan hydroxylase 2	Tph2
6775370	-1.2143719	1.1242065	methyl-CpG binding domain protein 3	Mbd3
6972168	-1.6105033	1.1907961	interferon induced transmembrane protein 3	Ifitm3
6965348	-1.0890988	1.204684	7-dehydrocholesterol reductase	Dhcr7
7017690	-1.0937941	1.2171323	RAB39B, member RAS oncogene family	Rab39b
6753917	1.0279727	1.2179854	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2
6899152	-1.1721867	1.2280631	Ras-like without CAAX 1	Rit1
6844653	1.0339851	1.2303587	B-cell leukemia/lymphoma 6	Bcl6
6866021	1.0983453	1.2474316	adrenergic receptor, beta 2	Adrb2
6943974	1.0614167	1.25142	tachykinin 1	Tac1
6995503	-1.0294454	1.2613597	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase	Pts
6794648	-1.1134688	1.3002629	IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like (S. cerevisiae)	Immp2l

7011603	-1.0755514	1.3117949	eukaryotic translation initiation factor 4E	Eif4e
6908078	-1.1777847	1.3173264	glutathione S-transferase, mu 1 glutathione S-transferase, mu 3	Gstm1 Gstm3
6839788	-1.0566921	1.3291864	DiGeorge syndrome critical region gene 6	Dgcr6
6854760	-1.0420585	1.3435034	glyoxalase 1	Glo1
6967542	-1.0575173	1.344331	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1 homolog (human)	Nipa1
6933072	-1.0771035	1.3490024	secreted phosphoprotein 1	Spp1
6832079	-1.1315472	1.3512352	adenylosuccinate lyase	Adsl
6992332	-1.0148205	1.6746818	glutathione peroxidase 1	Gpx1
6993524	1.23326	1.057774	melatonin receptor 1B	Mtnr1b
6991461	1.2471147	-1.0623244	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9	Slc9a9

Ameziane HERZINE

Etudes des effets neurodéveloppementaux induits par l'exposition périnatale à un pesticide, le glufosinate d'ammonium

De la neurogenèse au comportement

Résumé

Le glufosinate d'ammonium (GLA) est un herbicide largement utilisé dans l'agriculture. Comme cela est le cas pour la plupart des pesticides, ses effets neurotoxiques et développementaux n'ont été que partiellement étudiés. L'exposition précoce des pesticides peut affaiblir la structure de base du développement du cerveau et provoquer des changements permanents conduisant un large éventail d'effets à long terme sur la santé et/ou sur le comportement. Mes travaux de thèse ont permis de montrer que l'exposition périnatale à de faibles doses de GLA induisait des perturbations de la neurogenèse et de la migration des neuroblastes au niveau de la zone sous ventriculaire vers les bulbes olfactifs. De plus l'analyse transcriptomique cérébrale montre une modification significative de l'expression de nombreux gènes responsables de la dynamique du cytosquelette impliqué dans la régulation de la migration des neuroblastes. Etant un analogue structural du glutamate, le GLA pourrait agir sur le cytosquelette via la modification de la polyglutamylation de la tubuline. Cette hypothèse expliquerait les altérations cellulaires observées. Par ailleurs, avons mis en évidence dans cette étude, des troubles du comportement des souris exposées semblables à ceux observables chez les modèles murins des « troubles du spectre autistique » (ASD-like).

Mots-clés : Glufosinate d'ammonium, Pesticide, Migration neuroblastique, SVZ, Neurodéveloppement, Polyglutamylation, Neurotoxicologie, Trouble du Spectre Autistique.

Neurodevelopmental effects caused by prenatal exposure to a pesticide, glufosinate ammonium
from neurogenesis to behavior

Abstract

Glufosinate ammonium (GLA) is one of the most widely used herbicides in agriculture. As for almost all pesticides, potential adverse effects of GLA have not been investigated in the brain developmental neurotoxicity perspective. Indeed, early pesticides exposure may weaken the developing brain and cause permanent brain alteration which could lead to a wide range of the lifelong effects on health and/or behavior. As an illustration, we showed that perinatal exposure to low doses of GLA induced behavioral defects in mice adulthood, characterized by many similarities with Autism Spectrum Disorders phenotype. My thesis deals with the molecular aspect of this perinatal GLA exposure. I demonstrated that GLA induced disturbances of proliferation and neuroblast migration from the subventricular zone to the olfactory bulbs. These defects were associated with significant change in the expression of many genes involved in neuroblast migration and cytoskeleton regulation as observed by brain transcriptome analysis. I showed that GLA act on the cytoskeleton through modification of polyglutamylation of tubulin which lead to cell division/migration disturbances and cell differentiation defect. My work thus provides a new molecular link between pre- and post-natal exposure to the herbicide GLA and the onset of ASD like phenotype later in life. It also raises the fundamental concerns about the ability of current safety testing to assess risks of pesticide exposure during critical developmental periods.

Keywords: Glufosinate ammonium, Pesticide, Neuroblasts migration, SVZ, Neurodevelopment, Polyglutamylation, Neurotoxicology, Autism Spectrum Disorder.



Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires
INEM - UMR7355 CNRS - Université d'Orléans
3B, rue de la Férollerie - 45071 - ORLEANS

