



HAL
open science

Effets des néonicotinoïdes sur la neuroplasticité

Valentine de L'Estoile

► **To cite this version:**

Valentine de L'Estoile. Effets des néonicotinoïdes sur la neuroplasticité. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02364731

HAL Id: dumas-02364731

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02364731>

Submitted on 15 Nov 2019

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.

Année universitaire :2018-2019.....

Spécialité :Cursus Ingénieur Agronome

Spécialisation (et option éventuelle) :

Master BMC-Biologie Moléculaire et
Cellulaire

Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Effets des néonicotinoïdes sur la neuroplasticité

Par : Valentine de l'Estoile

Soutenu à Rennes

le 11 juin 2019

Devant le jury composé de :

BLAT Sophie

DESCHAMPS Stéphane

FRASLIN Jean-Marc

Le maître de stage ne fait pas partie du jury pour cette spécialité

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Patrimoine-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr>



Abstract

Neonicotinoids are widely used insecticides used in agriculture, aquaculture, in vector control treatments for pets and in urban pest control. They are appreciated because of their systemic effects and their low toxicity compared to other insecticides such as carbamate and organophosphate. They target the nicotinic receptors of the cholinergic system and act as agonist, creating a constant signal and induce death by paralysis in insect. Nicotinic receptors are different between insects and vertebrates, assuring a good protection of the manipulator. Indeed, those receptors are made up of 5 subunits of different types: α -type subunits and non- α -type subunits and the targeted alpha sub-units are different between insects and vertebrates which is the main argument to suggest the safety of those neonicotinoids. But the persistence of those molecule in the environment confirm the exposition of vertebrates and non-targeted insect like pollinator. In addition deleterious effects were also observed on behavior and anxiety in vertebrates as well, including rodents and zebrafish. Nicotinic receptors are expressed in the peripheral nervous system as well as in the brain in several areas. The cholinergic system impact the hippocampus, the hypothalamus and the amygdala among other regions and is interconnected with others neurotransmitter pathways. It controls different functions like anxiety, sleep or memory and play fundamental functions during development. Any alteration of this system would thus lead to altered neurobehavioral outcome.

In the current study, we investigated the effects of a specific neonicotinoid thiacloprid on central nervous system in parallel in zebrafish and mouse models. In our first study, we exposed zebrafish larvae from 1 day post fertilization (dpf) to 6 dpf to 10^{-6} M, 10^{-7} M or 10^{-8} M thiacloprid. 50-60 larvae were analyzed for each treatment and the experiments were repeated 7 times. Whole heads were analyzed by RT-qPCR for endocrine (estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta 1 and beta 2 and aromatase), proliferative (PCNA, neurogenin) and synaptic (synaptophysin, synapsin IIa and BDNF) markers. In a second study, we treated mice dams during gestation, from embryonic day 6 to 15 with 6 mg/kg/day thiacloprid via ingestion. 35 days old male and female offspring were euthanized and hippocampus, hypothalamus and amygdala were investigated for the expression of the same endocrine, proliferative and synaptic markers as those used in fish. We also analyzed the neuronal marker DCX (doublecortin). This set of experiments will allow us to better understand the potential impact of thiacloprid on the central nervous system during development.

In the fish, larval exposure to the 3 doses of thiacloprid did not affect the expression of any of the markers used in our experimental conditions when compared to control samples. In mouse offspring, several markers were significantly affected in different brain areas.

The quantification of endocrine-related markers showed that ER β transcription was significantly reduced in the hypothalamus only, independently of the sex of the offspring. The transcription of ER β was not affected in the hippocampus nor in the amygdala. Neither aromatase nor ER α transcription was affected in the 3 brain regions.

The prenatal exposure to thiacloprid also affected the transcription of proliferative markers. In the hippocampus, a decrease of the transcription of PCNA and DCX was observed in both male and female. Interestingly, we also observed an effect of the sex on DCX transcription. In the amygdala, DCX transcription increased in the exposed male and female. In the hypothalamus, nestin transcription was downregulated in female only. This shows that the thiacloprid is not toxic for all cell type but has a different impact on each area.

The quantification of synaptic markers showed that synapsin IIa transcription was downregulated for both sex in hippocampus and only in male in amygdala. A decrease of synaptophysin transcription was observed in both male and female hippocampus compared to control. This modulation of synaptic marker could be related to the reduction of the number of synapse in the tissue but also a decrease of connection between neurons characterized by a reduction of the activity in each synapse.

The difference between fish and mice suggest that the thiacloprid cannot past through the chorion. This is the foetal membrane around the larva, constituting the eggs during the 1 and 2 dpf. After the exit of the chorion, the larva seems protected by the Blood-Brain Barrier (BBB). In the mice, the BBB is not fully completed during the time of embryonic exposure and it seems that the thiacloprid can past trough the placenta. This can also bee linked to nicotinic receptor who can be different in zebrafish and have less connection with the thiaclopride. That will also reduce his potential effect.

Those results and conclusion confirm the presence of adverse effect of neonicotinoid on some vertebrate central nervous central system but we need further investigation. The difference between mice and fish also illustrate the difficulty to find a good model in toxicology. This study can be linked to results of others team who investigate the liver, blood and sexual organs of the same mice.

Remerciement

Ce rapport de stage de Master 2 a pu être réalisé grâce à la contribution et au soutien de plusieurs personnes à qui je voudrais exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

Je remercie en premier lieu, Bernard Jégou, le directeur de l'IRSET et Farzad Pakdel, le responsable de l'équipe TREC, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de l'équipe 6 de l'IRSET

Je remercie particulièrement Thierry Charlier, mon maître de stage, pour m'avoir encadré, m'avoir fait confiance sur cette étude, et pour m'avoir aidé à me poser les bonnes questions.

Colette Vaillant-Capitaine pour ses conseils scientifiques et sa disponibilité lors de mes préparations de PCR.

Fatima Smagulava, pour la coordination de l'étude entre les différentes équipes, et pour les dissections des souris.

Mado Gueguen pour son encadrement au quotidien et sa pédagogie.

Marine Simonneaux pour avoir été une binôme motivée et compétente, et m'avoir secondé sur les innombrables PCR de la fin de l'étude.

Les autres membres de l'équipe et l'ensemble du personnel de l'IRSET pour avoir créé un environnement scientifique stimulant et m'avoir permis d'inscrire mon étude dans un projet plus large.

Penelope, Morgane, Aymeric et les autres pour les « tea time », les discussions palpitantes, les échanges scientifiques et personnels.

Liste des abréviations

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

Ct : Cycle threshold

DCX : doublecortine

DJA : dose journalière autorisée

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

dNTP : désoxyriboNucléotide TriphosPhate

ER α : Estrogen receptor α (Récepteur aux œstrogènes α)

ER β : Estrogen receptor β (Récepteur aux œstrogènes β)

GAPDH : GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase

GFP : Green Fluorescence Protein

nAChRs : nicotinic Achetylcholin Receptor (Récepteur nicotinique à l'acétylcholine)

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

qPCR : Polymerase Chain Reaction quantitative

RT : Reverse Transcriptase

THI : Thiaclopride

TAE : Tris, Acétate, EDTA

Table des matières

1. Introduction :	1
1.1 Les Néonicotinoïdes	1
1.2 Mode d'action des néonicotinoïdes	1
1.3.1 Spécificité aux récepteurs des insectes	1
1.3.2 Barrière hématoencéphalique	2
1.4 Effets négatifs des néonicotinoïdes	2
1.4.1 Persistance des néonicotinoïdes	2
1.4.2 Effets des néonicotinoïdes sur les vertébrés	3
1.5 Importance du système cholinergique	4
1.6 Néonicotinoïdes et développement : intérêt de notre étude	4
2. Matériel et Méthodes	6
2.1 Exposition des larves de poisson-zèbre au thiaclopride	6
2.2 Prélèvement des échantillons de zébra Fish et extraction d'ARN	6
2.3 Exposition prénatale des souris au thiaclopride	6
2.4 Prélèvement des échantillons de souris et extraction d'ARN	6
2.5 Rétro-transcription	7
2.6 qPCR	8
2.7 Analyse des données PCR et traitement statistique	9
2.8 Electrophorèse	9
Résultats	10
3. Effets du thiaclopride sur les poissons-zèbres	10
3.2 Souris	10
3.2.1 Hippocampe	10
3.2.2 Hypothalamus	12
3.2.3 Amygdales	13
3.2.4 Electrophorèse et amorce ER β	14
4. Discussion	15
4.1 Chez les souris, effet du thiaclopride sur les synapses	15
4.2 Effet sur la prolifération différents, selon les régions du cerveau des souris	15
4.3 Effet du sexe chez les souris	15
4.4 Souris et barrières physiologiques	16
4.5 Etude chez le poisson-zèbre	16
4.6 Perspectives	17
5. Bibliographie	18

1. Introduction :

1.1 Les Néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont une famille d'insecticides mise au point dans les années 80 et utilisée principalement en protection des plantes mais également en protection urbaine contre les insectes nuisibles, en application vétérinaire et en pisciculture. Leur action systémique permet une protection intégrale de la plante via un traitement local. Cela permet d'éviter les pulvérisations et les traitements sur les champs pour privilégier un traitement de la graine avant ensemencement par exemple (Simon-Delso et al., 2015). Mais leur principal avantage réside dans leur mode d'action qui assure une bonne protection du manipulateur, tout en assurant une faible résistance des insectes cibles (Tomizawa and Casida, 2005).

1.2 Mode d'action des néonicotinoïdes

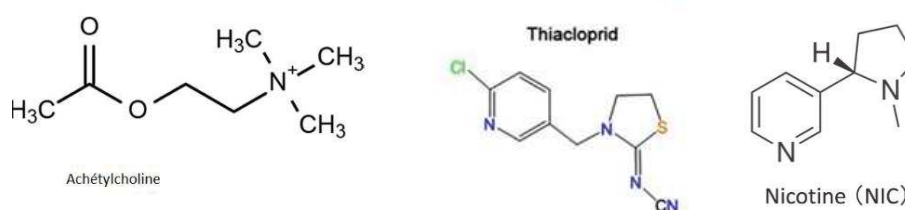


Figure 1 : Structure chimique de l'acétylcholine, du thiaclopride et de la nicotine

Ces molécules ont une structure proche de celle de la nicotine (Fig.1), et ciblent les récepteurs nicotiniques cholinergiques, récepteurs membranaires sensibles au neurotransmetteur acétylcholine (nAChRs). Ces récepteurs sont présents au niveau des synapses neuromusculaires, mais aussi des synapses neuronales du système cholinergique. Ils sont composés de cinq sous-unités formant un canal. Lors de l'activation du récepteur par l'acétylcholine, le canal s'ouvre et permet l'entrée dans la cellule d'ions sodium et potassium, dépolarisant la cellule et permettant la transmission rapide du signal. Les néonicotinoïdes exercent un effet agoniste sur certaines sous-unités des récepteurs nicotiniques du système cholinergique chez les insectes. Lorsqu'ils se fixent sur un canal, celui-ci reste ouvert et induit un signal continu, tétanisant les muscles et induisant une mort par paralysie.

1.3.1 Spécificité aux récepteurs des insectes

Il existe différents types de sous-unités constituant les récepteurs nAChRs : des sous-unités alpha, qui peuvent être de type $\alpha 1$ à $\alpha 9$ et des sous-unités non alpha ($\beta 1$ à $\beta 4$, δ , ϵ ou γ) et la constitution des pentamères diffère selon les types synaptiques et les espèces. Par exemple, le récepteur caractéristique des synapses neuromusculaires des muscles squelettiques est constitué de deux sous-unités $\alpha 1$, et des sous-unités $\beta 1$, δ et γ . Dans le cerveau, le plus étudié est le récepteur $\alpha 4\beta 2$ (2 sous-unités $\alpha 4$ et trois sous-unités $\beta 2$). Cette différence dans la combinaison des sous-unités va définir la sensibilité des récepteurs aux molécules. Celle-ci est notamment

dû à la différence de structure chimique entre les différents types de sous-unités, qui présentent alors des sites de fixations différents aux molécules (Ihara et al., 2003) Ainsi, il est important de noter une différence entre les récepteurs des insectes et ceux des vertébrés et des mammifères en particulier, notamment au niveau des sous-unités alpha. Cela a permis de mettre en évidence des sites de fixations spécifiques aux néonicotinoïdes sur les récepteurs des insectes (Fig.2).

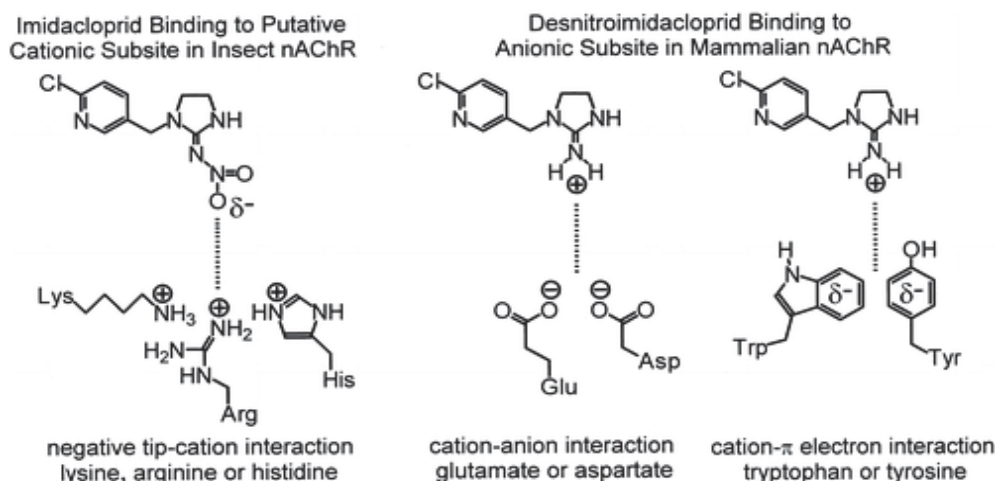


Figure 2 : Représentation schématique de l'interaction de l'imidaclopride avec les sites ioniques caractéristique des récepteurs des insectes et des mammifères. D'après Tomizawa et al.2000

Ainsi, les néonicotinoïdes peuvent former des liaisons fortes avec les sous-unités alpha des insectes, les sous-unités des mammifères ont une affinité moindre (Tomizawa et al., 2000).

1.3.2 Barrière hématoencéphalique

Ces récepteurs nAChRs sont très présents dans le système nerveux central qui apparaît, alors comme une cible potentielle des néonicotinoïdes. Après ingestion et passage de la paroi intestinale, l'apport de ces molécules au cerveau est assuré par la circulation sanguine. Toutefois, le système nerveux des vertébrés possède des protections qui lui sont propres, dont la barrière hématoencéphalique (BHE) qui permet de limiter les échanges entre la circulation sanguine et le tissu nerveux. Elle est, entre autres, composée de cellules endothéliales liées par des jonctions serrées et de cellules gliales permettant le passage actif mais contrôlé de molécules avant leur accès au tissu nerveux. Actuellement, aucune étude n'a clairement démontré que les néonicotinoïdes soient capables de passer cette barrière.

Les néonicotinoïdes ont donc été considérés comme spécifiques des insectes et assurant une bonne protection des manipulateurs et des consommateurs, tout en garantissant leur efficacité.

1.4 Effets négatifs des néonicotinoïdes

1.4.1 Persistance des néonicotinoïdes

Cependant, des impacts négatifs des néonicotinoïdes ont également été mis en évidence, aussi bien chez les insectes que chez les mammifères. En effet, la distribution systémique de ces insecticides dans toute la plante implique que la molécule se retrouve dans les fruits et les

racines. Les néonicotinoïdes vont aussi diffuser dans l'eau, le sol et l'air autour des champs traités. Or, ces molécules sont persistantes ; leur temps de demi-vie se compte en mois ou en années selon les molécules et l'environnement. Ainsi, le temps demi-vie du thiaclopride dans un milieu aquatique aérobie est compris entre 10 et 63 jours (US EPA). Plusieurs espèces non ciblées, sont ainsi exposées (Chen et al., 2014). Parmi celles-ci, des insectes qui ne sont pas nuisibles, mais qui restent néanmoins sensibles à ces molécules, comme les pollinisateurs (Pisa et al., 2015) .

1.4.2 Effets des néonicotinoïdes sur les vertébrés

Des études plus récentes ont également montré la sensibilité des mammifères à ces molécules, notamment à travers leurs effets sur la fonction reproductive, comme des baisses du taux de fécondité ou de la taille moyenne des petits (Gibbons et al., 2015). Ainsi, bien que les néonicotinoïdes aient été développés pour cibler de façon privilégiée les récepteurs des invertébrés, il semblerait que certains de ces néonicotinoïdes soient capables d'affecter les vertébrés également, bien que les sous-unités cibles ne soient pas clairement caractérisées. De plus, certaines études proposent l'hypothèse que les néonicotinoïdes peuvent passer la BHE, car des traces de ces molécules ont été retrouvées dans le cerveau après une injection péritonéale chez les souris (Terayama et al., 2016). Cependant, aucun mécanisme d'action n'a pu être mis en évidence au niveau moléculaire.

Des effets ont été observés sur l'anxiété ou les comportements sociaux et ce dans différents modèles de vertébrés. Par exemple, en exposant des poissons-zèbres de 4 heures à 5 jours post-fertilisation à de fortes doses d'imidaclopride, des effets sont observés sur le comportement à l'âge adulte. Une réduction du comportement dans le noir, et une hyper-réaction aux stimuli ont été observés (Crosby et al., 2015) à long terme après cette exposition néonatale. Cela est interprété comme un effet anxiogène des néonicotinoïdes. De même, des souris mâles soumis à une administration orale de clothianidine, expriment des comportements anxieux. Ainsi, ils se déplacent moins sur les bras ouverts d'un labyrinthe élevé. Les régions cérébrales associées à ces troubles comportementaux sont maintenant clairement connues, telles que le cortex préfrontal, y compris le gyrus cingulaire, l'hippocampe, l'hypothalamus et les amygdales (Hirano et al., 2018).

Il semblerait que ces modifications comportementales telles que l'anxiété soient liées à des altérations de la neuroplasticité au niveau de l'hippocampe. En effet, l'hippocampe, en interaction avec l'hypothalamus, le cortex préfrontal et les amygdales, est une région clef dans le contrôle du stress et de l'anxiété. Une étude récente (Nakayama et al., 2019), s'est intéressée aux effets de deux néonicotinoïdes de première génération (l'acétamipride et l'imidaclopride)

sur la neurogenèse chez le jeune rat. Après gavage au cours des premiers jours de vie (P12 à P26), ils observent une baisse des marqueurs de prolifération et de neurones immatures, mesurée par immunocytochimie dans l'hippocampe qui pourrait confirmer un impact de ces molécules sur cette région du cerveau.

1.5 Importance du système cholinergique

Ces régions sont reliées entre elles par un circuit neuronal dont le neurotransmetteur majeur est l'acétylcholine : le système cholinergique. Ce système forme un réseau présent dans plusieurs zones du cerveau, s'intercalant dans les autres réseaux neuronaux (Holgate and Bartlett, 2015). Des altérations ou des modifications dans la transmission des messages dans ce système peuvent donc affecter plusieurs régions et au vu des liens importants entre les différents réseaux, cela peut impacter l'ensemble des différents systèmes de neurotransmetteurs et des fonctions neuronales (Fig.3).

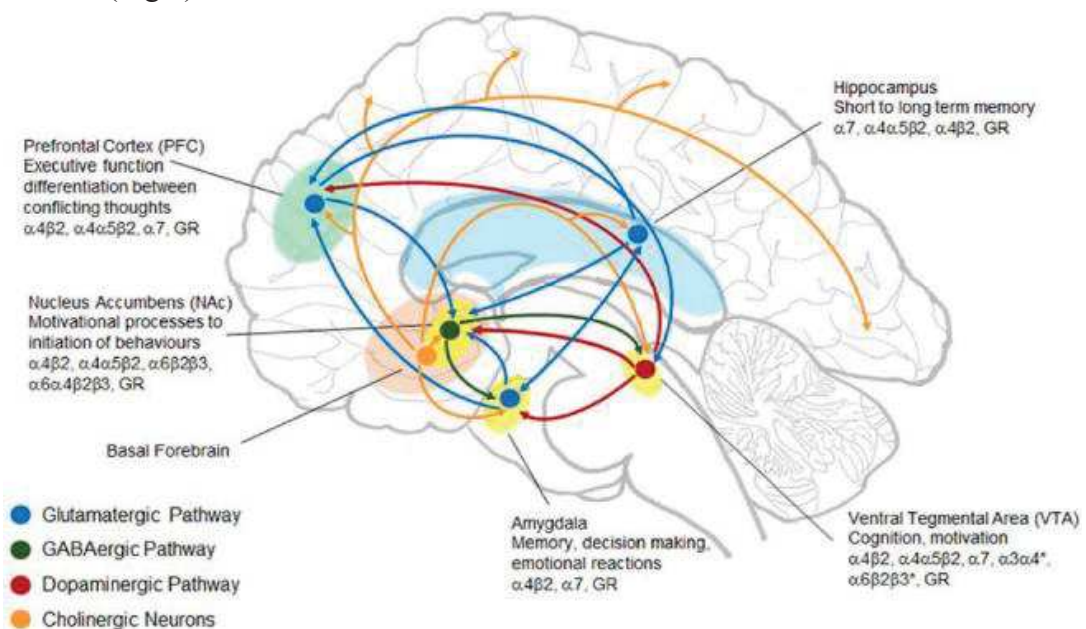


Figure 3 : Système cholinergique et ses liens avec les autres systèmes de neurotransmetteurs.
D'après Holgate and Bartlett, 2015

1.6 Néonicotinoïdes et développement : intérêt de notre étude

Les périodes embryonnaires et pré-pubertaires sont fondamentales pour le développement du système nerveux central. Ce sont des périodes de prolifération neuronale intense et de mise en place des réseaux neuronaux. Toute altération de ce développement conduira à des effets à long terme sur le système nerveux central et sur le comportement. Il est donc intéressant d'étudier les différentes étapes conduisant à la mise en place du système nerveux central. Nous utiliserons pour cela des marqueurs de la prolifération cellulaire (PCNA), de la différenciation neuronale (PCNA, Nestine, Neurogenine, DCX) (Roybon et al., 2009) (Fig.4) et de fonctionnalité neuronale (BDNF, Synaptophysine, Synapsin IIa). Les protéines impliquées dans l'aspect neuro-endocrinien (récepteurs aux œstrogène $Er\alpha$ et $Er\beta$, ainsi que l'aromatase) seront

également investiguées car le système endocrinien est connu pour son implication dans l'anxiété.

A ce jour aucune étude sur l'exposition prénatale n'a été effectuée. En effet, lors de la gestation, la barrière hématoencéphalique n'est pas complètement formée et seule la barrière placentaire pourrait empêcher les molécules de circuler entre la mère et la descendance. Il est donc important d'étudier les effets d'une exposition maternelle sur la descendance, et de déterminer si cette exposition peut affecter les réseaux neuronaux à long terme. Ainsi notre étude se focalisera sur un modèle murin soumis à une exposition prénatale, complété par un modèle de poisson-zèbre, exposé pendant le stade larvaire. Ainsi, l'utilisation de deux modèles permettra de prendre en compte ces deux hypothèses. Les travaux *in vitro* précédemment menés dans le laboratoire nous ont conduit à choisir le thiaclopride (THI), un néonicotinoïdes de première génération, comme molécule de travail.

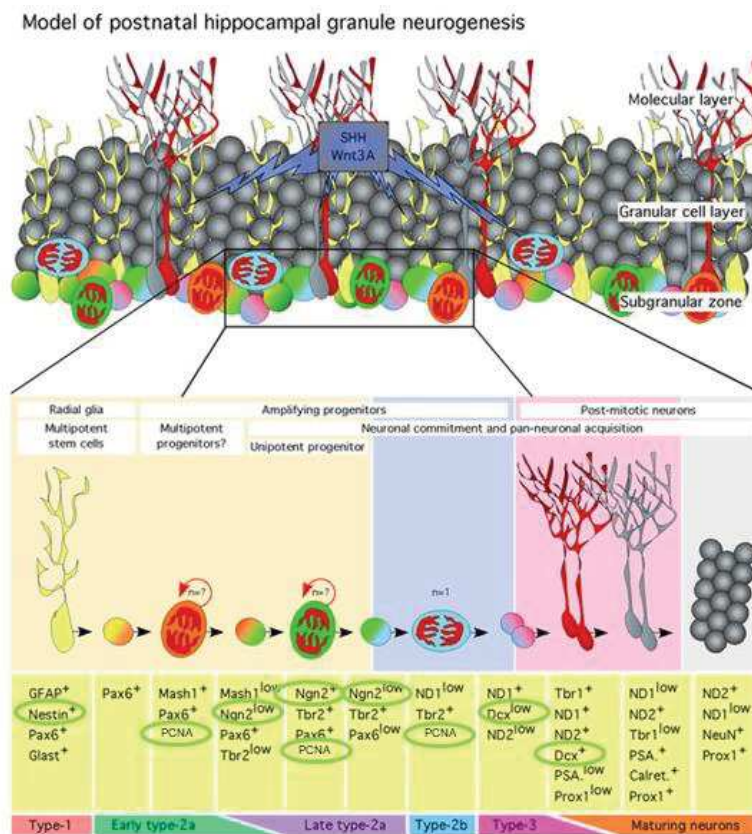


Figure 4 : Présence des marqueurs au cours de la neurogenèse. D'après Roybon et al. 2009.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Exposition des larves de poisson-zèbre au thiaclopride

Des larves de poisson-zèbre tg(CYP19a1b:GFP), dans lesquelles un gène GFP associé au promoteur de l'aromatase cérébrale a été intégré au génome, ont été exposées à du thiaclopride pendant 6 jours à compter du jour de ponte avec changement quotidien de milieu de balnéation. Quatre groupes, d'environ 200 larves, ont été constitués : un groupe témoin exposé à du DMSO (40 µL dans 40 mL d'eau), et trois groupes soumis à faibles doses de thiaclopride : 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} mol.L⁻¹. Ces traitements ont réitérés sept fois sur différentes pontes.

2.2 Prélèvement des échantillons de zébra Fish et extraction d'ARN

Le 7^{ème} jour, les zebrafish ont été euthanasiés et les têtes prélevées et regroupées en deux tubes de 60 têtes environ pour chaque condition, avant d'être congelées dans de l'azote liquide. L'ARN total des têtes de zebrafish a été extrait à l'aide du kit NucleoSpin RNA Plus de Macherey-Nagel.

2.3 Exposition prénatale des souris au thiaclopride

Des femelles CD 1 gestantes ont été gavées au thiaclopride du sixième au quinzième jour de gestation. Quatre groupes de 4 souris ont été constitués : un groupe témoin ainsi que trois groupes soumis à différentes doses de thiaclopride : 0.06, 0.6 et 6 mg/kg/jour, la plus faible correspondant à l'DJA ou dose journalière autorisée. La descendance mâle et femelle a été euthanasiée à 35 jours, au moment de l'apparition de la puberté, à raison de 2 mâles et 2 femelles par portée. Dans le cadre de ce travail, seuls les effets de la dose la plus élevée ont été investigués.

2.4 Prélèvement des échantillons de souris et extraction d'ARN

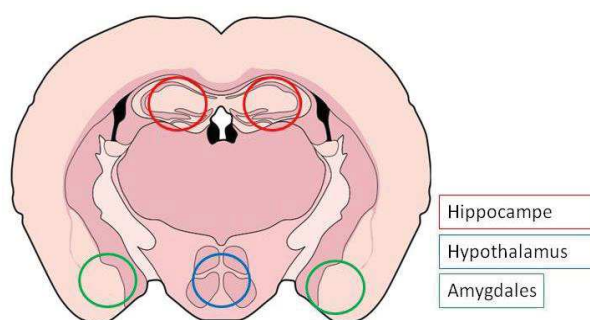


Figure 5 : Coupe frontale d'un cerveau de souris et mise en évidence des zones prélevées.

Au jour 35 du développement, une prise de sang a été réalisée par ponction rétro-orbitale puis les animaux ont été euthanasiés. Le cerveau a été prélevé et congelé directement dans de la carboglace pilée et conservé à -80 °C jusqu'à utilisation. Les cerveaux ont été coupés en sections épaisses de 300 µm au cryostat (Microm HM560, ThermoFischer Scientist), et des carottes ont été collectées dans 4 zones d'intérêt en utilisant le brain punch set de Stoelting,

diamètre 1.25 mm: le gyrus cingulaire, hypothalamus, hippocampe et amygdales. Le cervelet a également été prélevé entièrement. Dans le cadre de ce travail, seuls l'hypothalamus, l'hippocampe et les amygdales ont été étudiés (Fig. 5) A partir de ces échantillons, l'ARN total ont été extrait à grâce au kit NucleoSpin pour Nucléozol de Macherey-Nagel, et mis en solution dans 40 µL d'eau RNase free pour le gyrus cingulaire, l'hypothalamus, l'hippocampe et les amygdales, et 60 µL pour le cervelet.

2.5 Rétro-transcription

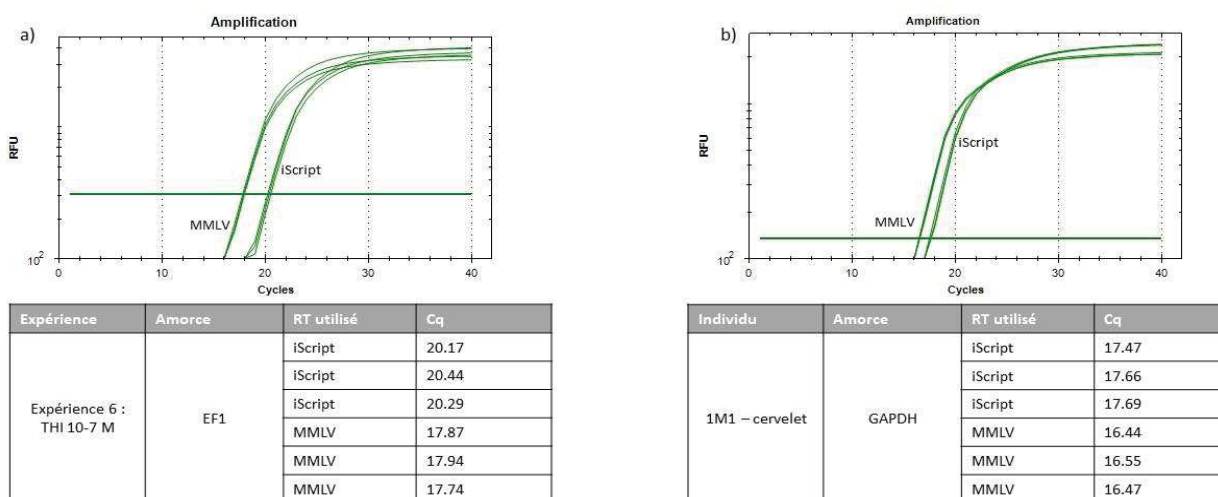


Figure 6 : Comparaison des deux protocoles de RT : iScript et M-MLV dans les deux modèles animaux. A : courbe d'amplification et valeurs de Cq (quantification cycle). Expérience réalisée sur l'ARN total extrait de l'itération 6 de l'exposition des poissons zèbres à une concentration de 10-7M de THI. B : Courbe d'amplification et valeurs de Cq. Expérience réalisée sur l'ARN extrait du cervelet d'une souris mâle provenant d'une portée non-traitée au THI. Valeurs et courbes obtenues via le logiciel BioRad CFXmanager.

Un premier essai de transcription inverse (RT) a été réalisé à l'aide du kit iScript de BioRad. Cependant, les valeurs de Ct (threshold cycle : le nombre de cycle nécessaire pour atteindre le niveau seuil) obtenues étaient élevées, témoignant d'un manque d'efficacité de l'amplification par rapport aux valeurs couramment obtenues dans notre laboratoire. Ainsi les valeurs obtenues pour les gènes étudiés étaient trop élevées pour de nombreuses combinaisons d'amorces pour permettre une interprétation correcte (> 32). Une seconde méthode a été testée et comparée à la précédente, et cela pour les deux modèles animaux (Fig.6). L'ARN a été transcrit en utilisant la reverse transcriptase M-MLV de Promega, selon le protocole suivant : un microgramme d'ARN est déposé dans un tube stérile de 1.5 mL, avec 1 µL de radom primers. Le volume total est ensuite ajusté à 10 µL avec de l'eau RNase free et l'hybridation entre l'ARN et les amorces est permise par une incubation à 65 °C pendant 10 min. Puis, le tube est conservé sur glace et l'on ajoute 15 µL du mélange RT, soit pour chaque tube : 5 µL de tampon M-MLV-RT 5X (Promega), 0.6 µL d'un mélange de dNTP à 25 mM, 1 µL de Reverse Transcriptase MMLV à 200 U.µL⁻¹ et 8.4 µL d'eau. Le mélange est incubé 1h30 à 37 °C, avant une dilution au 40^{ème}

permettant de réaliser la PCR. Au vu des résultats d'amplification par PCR, c'est cette seconde méthode de transcription inverse qui a donc été privilégiée

2.6 qPCR

La PCR a été réalisée avec 2.5 µL d'amorces concentrées à 300 nM, et 5 µL de Syber Green (iTaq SYBER, Biorad) pour 2.5 µL de RT au 40^{ème}. Chaque point a été réalisé en triplicat. Les amorces qui ne proviennent pas de la littérature ont été définies grâce à la fonction « Pick Primers », proposé à partir de la séquence complète de l'ARN du gène, présente dans la base de données du NCBI (Tab.1). Les gènes de ménage utilisés sont l'EF1 chez le poisson-zèbre et GAPDH pour la souris.

organisme	gène	Amorce Reverse	Amorce Forward
poisson-zèbre	EF 1	CCGCATTGTAGATCAGATGG	AGCAGCAGCTGAGGAGTGAT
	Erα	GCTGCAGCTCCTCCTCTGG	CTGGAGATGCTGGACGCTCA
	Erβ1	CCAGCAGACACAGCAGCTTGG	GATCCTCCTGAACTCCAACATG
	Erβ2	CCAGCAGATTCAGCACCTTCCC	GATCCTGCTCAACTCTAATAAC
	Aromatase	CATACCTATGCATTGCAGACC	TCGGCACGGCGTGCAACTAC
	PCNA	GGACAGAGGAGTGGCTTTGG	CTCACAGACCAGCAACGTCG
	BDNF (Özdemir et al., 2018)	GGCGAAGAGCGGACGAATATC	GGCGAAGAGCGGACGAATATC
	Synaptophysine	CCCTGAGAGCTGGCATACTG	ATGCAAAGAGCTGCACGAAC
	Nestine (Venables et al., 2016)	AGGGTGTTTACTTGGGCTGAAA	ATGCTGGAGAAACATGCCATGCAG
	Synapsine IIa (Fan et al., 2010)	TGGTTCTCCACTTTCACCTT	GTGACCATGCCAGCATTTC
	Neurogenine 1 (Soares et al., 2017)	TGCCAGATGTAGTTGTGAGCGAA	TGCACAACCTTAACGACGCATTGG
	souris	GAPDH	ACCACCCTGTTGCTGTAGCC
Erα		TTGCTGAGGCTTCCTCTTGG	AGGCAAAGGGATTCCAGGG
Erβ		CCTTACAGGACCAGACACC	TTTAGCCACCCACTGCCAAT
Aromatase		GAGGTTACGCCACTACTC	ATGAGGACAGGCACCTTGTG
PCNA		CGTGAGACGAGTCCATGCTC	GCCAGACCTCGTTCCTCTTAG
DCX		ACGTTGACAGACCAGTTGGG	GACCTGACCCGATCCTTGTC
Synaptophysine		TCTCTTGAGCTTTGCCAC	ATCAACCCGATTACGGGCAG
BDNF		GGTAAGAGAGCCAGCCACTG	TTGTTTTGTGCCGTTTACCA
Nestine		AGAGCACCTGCCTCTTTTGG	GTGACCTTGGGTTAGAGGC
Synapsine IIa		TCAAGTCATGGGACATCGCC	GAGACCATCCGGAGCTTGAG
Neurogenine 1		TACTGGGGTCAGAGAGTGGGT	CGCTTCGCCTACAACACTACATC

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour les qPCR.

2.7 Analyse des données PCR et traitement statistique

À l'issue de la PCR, les Ct (threshold cycle) ont été traités selon la méthode du ΔC_t en utilisant un gène de ménage comme référence. Pour chaque individu, la valeur $2^{-(C_{t\text{gène}} - C_{t\text{gène de référence}})}$ a été calculée. Ainsi, les variations internes éventuelles ont été négligées. Puis, les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad : une Anova à un facteur pour comparer les quatre conditions d'exposition du poisson-zèbre et une Anova à deux facteurs (dose et sexe) pour étudier les effets chez les souris. Si les données ne respectaient pas les conditions d'application d'une ANOVA à deux facteurs, à savoir, homogénéité des variances et répartition selon une loi normale, un test de Mann-Whitney permet de comparer les conditions deux à deux en conditions non-paramétriques. Les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives si $p < 0.05$.

2.8 Electrophorèse

Pour vérifier la présence de plusieurs variants dans un résultat d'amplification PCR, une électrophorèse a été réalisée sur les mix de PCR issus de l'hypothalamus et l'amygdale et amplifiés avec les amorces ER β . Un gel d'agarose à 2% a été réalisé avec 1 μL de GelRed Nucleic Acid (Biotium). 10 μL de mix PCR ont été déposés sur ce gel avec 2 μL de Loading Buffer, dans un tampon de migration TAE 1X. Nous avons réalisé la migration pendant 2h30, à 50 mV. Un marqueur de poids moléculaire : GeneRuler bp DNA ladder (Fermentas) est utilisé en trois points du gel. La révélation est effectuée avec le GelDoc XR+ de Biorad.

Résultats

3. Effets du thiaclopride sur les poissons-zèbres

Les PCR réalisées chez le poisson-zèbre ont permis d'étudier la transcription de plusieurs marqueurs : des marqueurs neuroendocriniens ($ER\alpha$, $ER\beta1$, $ER\beta2$, et Aromatase), des marqueurs de prolifération (PCNA, Nestine, Neurogenine), des marqueurs de fonctionnalités neuronales (BDNF, Synapsine IIa, Synaptophysine) et un marqueur de survie cellulaire : la caspase 3. Sur tous ces marqueurs, aucune différence significative d'expression n'a été remarqué (Fig. 7), au regard des différentes doses de thiaclopride utilisées ($10^{-8}M$, $10^{-7}M$ et $10^{-6}M$) car $0.08641 < F(3, 24) < 1.505$.

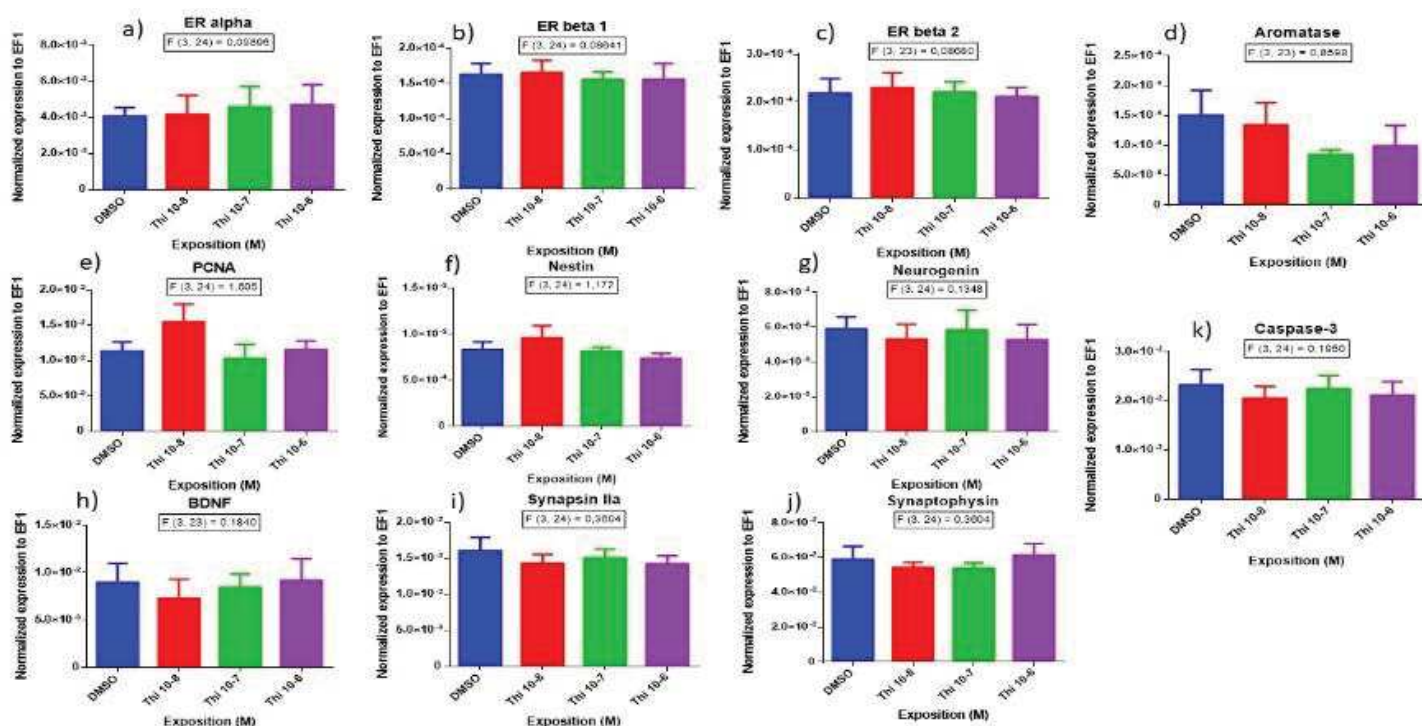


Figure 7 : Effet du thiaclopride sur la transcription des marqueurs de neuroplasticité chez le poisson-zèbre. Analyse des marqueurs endocriniens (a-d), des marqueurs de prolifération (e-g) et des marqueurs synaptiques (h-j). Analyse également de la survie cellulaire (k). Les cadres indiquent les valeurs des ANOVA.

3.2 Souris

3.2.1 Hippocampe

Marqueurs neuroendocriniens

Après l'exposition des mères à 6mg/kg/jour de thiaclopride du jour 6 à 15 de la gestation, les marqueurs des récepteurs aux œstrogènes et de l'aromatase n'ont pas été statistiquement modifiés chez les jeunes, par rapport aux portées contrôles. Le traitement n'affecte donc pas la transcription des marqueurs endocriniens, dans nos conditions expérimentales. (Fig. 8a-c).

Prolifération et différenciation

L'exposition périnatale au thiaclopride a affecté la transcription de plusieurs marqueurs de prolifération et de différenciation. Ainsi, une diminution significative du niveau de transcrite du gène PCNA est observée (Fig. 8d) : les résultats du test de Mann-Whitney indiquent $U = 2$ pour

les mâles et de $U = 0$ pour les femelles dans l'évaluation du facteur traitement. C'est également le cas pour le marqueur DCX, associé aux neuroblastes et donc aux étapes précoces de la différenciation neuronale (Fig. 8g). Le sexe des souris étudiées affecte également le niveau de transcrits de ce gène sans interaction avec le traitement. En effet, une ANOVA à deux facteurs a pu être réalisée et les statistiques de test associées aux facteurs traitement et sexe sont respectivement de $F(1,26) = 31.67$ et $F(1,26) = 5.643$ alors que le facteur interaction n'est pas significatif. En revanche, la nestine et la neurogenine ne sont pas affectées par le traitement.

Marqueurs synaptiques

En se concentrant sur les marqueurs synaptiques, il ressort que la transcription de la synapsine IIa et de la synaptophysine est également diminuée par l'exposition au thiaclopride (Fig. 8i et 8j). En effet, les statistiques de test associées à ces deux marqueurs pour le facteur traitement sont de $F(1,27) = 107.4$ et $F(1,25) = 32.39$ respectivement.

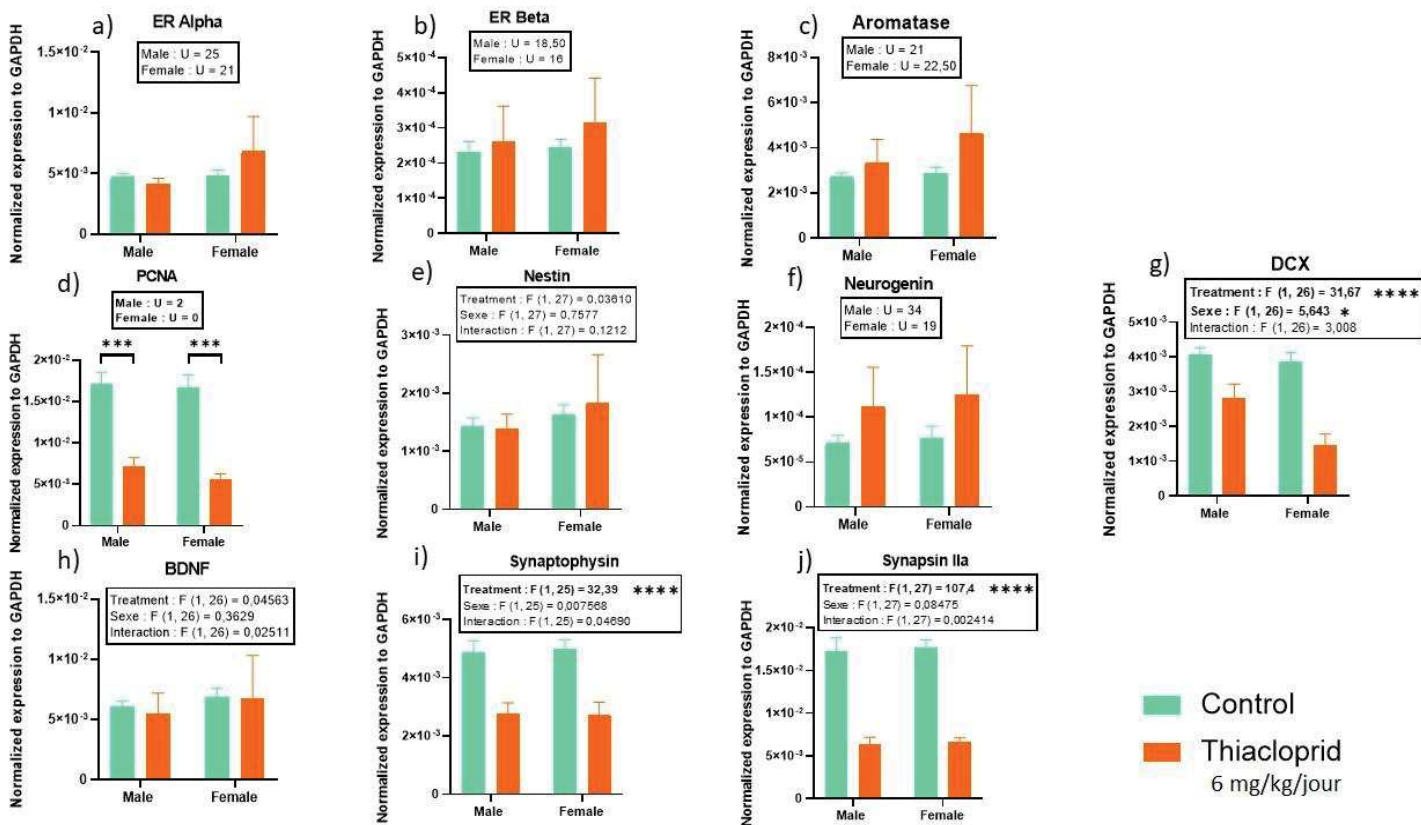


Figure 8 : Effet du thiaclopride sur la transcription des marqueurs de neuroplasticité chez la souris dans l'hippocampe. Expression des gènes rapportée au gène de référence. Analyse des marqueurs endocriniens (a-c), des marqueurs de prolifération et de différenciation (d-f) et des marqueurs de fonctionnalité neuronale (h-j). Les cadres indiquent les valeurs des statistiques (ANOVA ou Mann Whitney. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.2.2 Hypothalamus

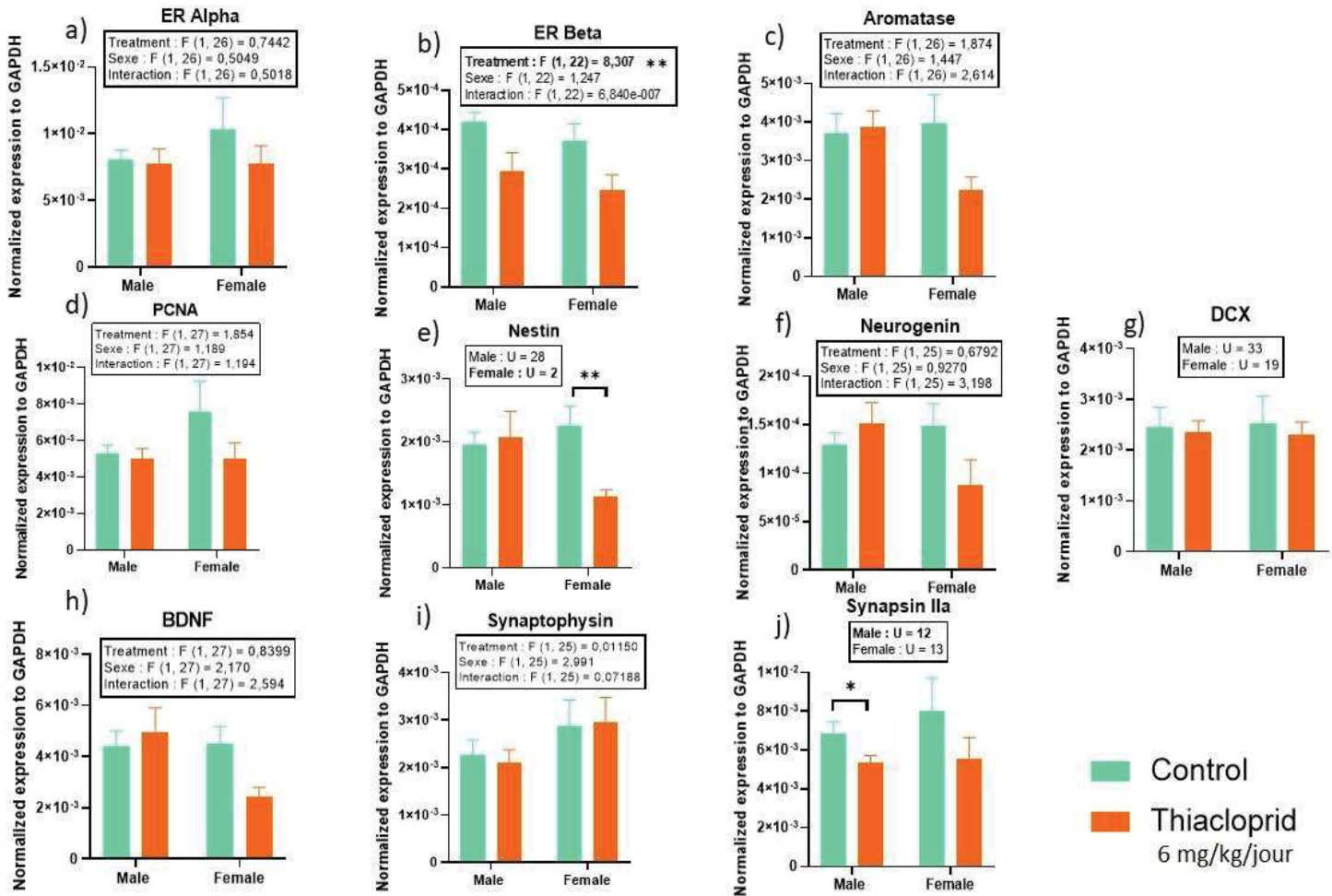


Figure 9 : Effet du thiaclopride sur la transcription des marqueurs de neuroplasticité chez la souris dans l'hypothalamus. Expression des gènes rapportée au gène de référence. Analyse des marqueurs endocriniens (a-c), des marqueurs de prolifération et de différenciation (d-g), des marqueurs de fonctionnalité neuronale (h-j). Les cadres indiquent les valeurs des statistiques (ANOVA ou Mann Whitney. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Marqueurs neuroendocriniens

Tout d'abord, les marqueurs des récepteurs aux œstrogènes alpha et de l'aromatase ne sont pas statistiquement affectés par l'exposition des mères au thiaclopride. C'est par contre le cas du récepteur $ER\beta$, pour lequel, un effet significatif du traitement est observé ($F(1,22) = 8.307$). (Fig. 9a-c)

Prolifération et différenciation

Parmi les marqueurs de prolifération et de différenciation (Fig. 9d-g), la nestine a été impactée par le traitement, mais uniquement chez les femelles ($U = 2$) où sa transcription a été diminuée. Les autres marqueurs utilisés n'ont pas été significativement affectés (PCNA, DCX, neurogenine).

Fonctionnalité neuronale

Un dernier marqueur a vu sa transcription diminuée par le traitement au THI : la synapsin IIa, qui est un marqueur synaptique (Fig. 9j) mais uniquement chez les individus mâles ($U = 12$).

Alors que les autres marqueurs de fonctionnalité (BDNF et synaptophysine) ne présentaient pas de changement significatif (Fig. 9h et 9i)).

3.2.3 Amygdales

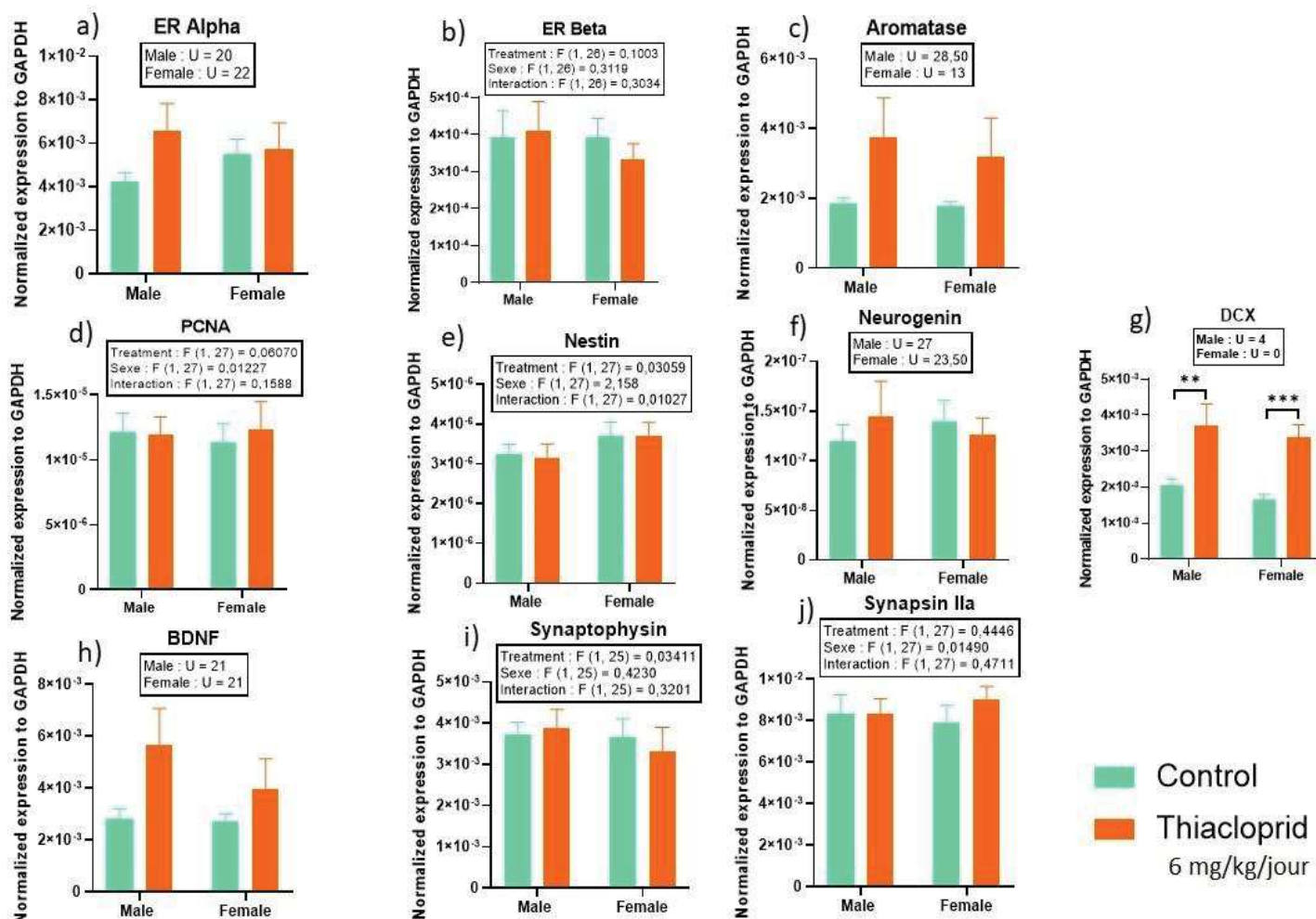


Figure 10 : Effet du thiaclopride sur la transcription des marqueurs de neuroplasticité chez la souris dans l'amygdale. Expression des gènes rapportée au gène de référence. Analyse des marqueurs endocriniens (a-c), des marqueurs de prolifération et de différenciation. Les cadres indiquent les valeurs des statistiques (ANOVA ou Mann Whitney. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Marqueurs neuroendocriniens :

Dans cette région du cerveau, la transcription des marqueurs endocriniens n'était pas affectée par le traitement. Les résultats des tests effectués sur ER α , ER β et l'aromatase étaient non significatifs (Fig. 10a-c)

Prolifération et différenciation

L'étude des marqueurs de prolifération, montre un impact du traitement sur le marqueur double-cortine (Fig. 10g). La transcription de celui-ci était augmentée par le traitement, aussi bien chez les mâles que les femelles (U = 4 et U = 0). En revanche, ce n'était pas le cas des marqueurs PCNA, nestine et neurogénine (Fig. 10d-f)

Marqueurs de fonctionnement neuronal

Parmi les marqueurs de fonctionnement neuronal utilisés, aucun n'était significativement affecté par le THI. (Fig 10h-j)

3.2.4 Electrophorèse et amorce ER β

Lors de l'analyse des plaques PCR de l'amygdale et de l'hypothalamus, il était apparu que les amorces ER β choisies conduisaient à l'apparition de trois types de profil sur les courbes de fusion : ceux avec un pic aux alentours de 80°C, avec un pic à 83/82.5°C ou avec ces deux pics. Cela suggèrait la reconnaissance de deux variants du gène ER β par le couple d'amorces. Pour vérifier cela, une électrophorèse a mis en valeur la présence de deux bandes (Fig. 11) dans les produits de PCR. Pour vérifier s'il s'agit bien de différents variants du gène, des expériences de séquençages sont en cours.

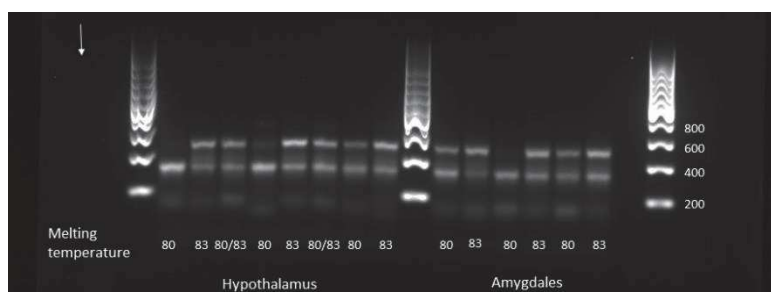


Figure 11: Mise en évidence de deux bandes dans les PCR utilisant le couple d'amorces ER β . Gel d'électrophorèse des produits de PCR suivant le profil de courbe de fusion détecté

4. Discussion

Nous avons étudié l'effet du thiaclopride sur des marqueurs neuroendocriniens, de prolifération cellulaire et de différenciation et de fonctionnalité neuronale. Des effets ont été observés chez la souris, mais pas chez le poisson-zèbre.

4.1 Chez les souris, effet du thiaclopride sur les synapses

Les marqueurs synaptophysine et synapsine IIa sont influencés par le traitement dans l'hippocampe et les amygdales. La synaptophysine est un marqueur des vésicules synaptiques. La synapsine IIa est une phosphoprotéine associée aux relargages des vésicules synaptiques (Hilfiker et al., 1999). L'exposition au thiaclopride entraîne une diminution de la transcription de ces marqueurs conduisant à plusieurs interprétations.

En effet, cela peut indiquer une baisse du nombre de connexions synaptiques, et donc indiquer un nombre moins important de synapses. Mais cela peut aussi être lié une baisse d'activité synaptique pour le même nombre de synapses. Il est important de garder à l'esprit que ces marqueurs ne sont pas spécifique du système cholinergique et les effets observés peuvent avoir lieu dans un autre système de neurotransmetteurs. En effet, le système cholinergique est interconnecté avec d'autres systèmes de neurotransmetteur, comme le système glutaminergique ou dopaminergique.

4.2 Effet sur la prolifération différents, selon les régions du cerveau des souris

Dans l'hippocampe, le traitement affecte la transcription du marqueur PCNA et DCX. Hors, PCNA est une protéine impliquée dans les mécanismes de prolifération et de réplication (Kelman, 1997), c'est un marqueur des cellules progénitrices. La double-cortine est une protéine associée aux microtubules (Gleeson et al., 1999); c'est un marqueur des neuroblastes. Ainsi, le traitement inhibe la prolifération dans l'hippocampe, alors qu'un effet inverse est observé dans l'amygdale. En effet, la transcription du marqueur DCX y est plus importante chez les individus traités que chez les individus témoins.

Cette différence indique que le THI n'est pas toxique pour tous les types cellulaires mais affecte de façon différente chacune des régions. Cela peut suggérer qu'un seul type cellulaire soit affecté, et que selon la répartition des récepteurs nAChRs, il ne soit pas activé de la même façon. Cela est peut être lié à la disposition des récepteurs nAChRs dans ces régions et à la connexion avec les autres systèmes de neurotransmetteur.

4.3 Effet du sexe chez les souris

Dans l'hippocampe, le sexe a un effet significatif sur la transcription du facteur DCX. On remarque également que les marqueurs synapsine IIa et nestin ne sont affectés par le traitement que pour un seul des deux sexes dans l'hypothalamus (mâle pour la synapsine IIa et femelle

pour la nestine). Ainsi la sensibilité au traitement est liée au sexe des individus traités. Les stéroïdes sexuels pourraient avoir un effet activateur ou organisateur. Un effet organisateur correspondant à un effet permanent lié à la présence d'une molécule durant une fenêtre temporelle précise et un effet activateur correspondant à un effet réversible dépendant de la présence de la molécule. La puberté étant plus précoce chez les femelles que chez les mâles, elle pourrait être à l'origine d'un effet activateur.

4.4 Souris et barrières physiologiques

Cette étude étant réalisée à l'échelle physiologique, il est important de se demander comment le thiaclopride a pu avoir ces effets sur la transcription des différents gènes, et notamment, si il a atteint les récepteurs AChRs présents dans le cerveau.

Chez les souris, la BHE commence à se mettre en place avec l'apparition de l'angiogenèse, à partir du 10^{ème} jour de développement embryonnaire. Elle n'est donc pas présente au début de l'exposition au THI et n'est pas complètement formée à la fin de celle-ci. On peut donc émettre l'hypothèse qu'elle n'est pas un facteur limitant l'accès du THI aux récepteurs nAChRs du système nerveux central. Une autre barrière est également mise en jeu car le traitement est administré aux mères durant la gestation et les cerveaux de la progéniture sont investigués. Le placenta forme une surface d'échange entre la mère et l'embryon, il permet des échanges mais assure aussi une filtration. Aujourd'hui, aucune étude n'a démontré la possibilité du thiaclopride à passer la barrière placentaire. Cependant, les effets observés sous-entendent la capacité du thiaclopride à passer à travers certaines de ces barrières mais les effets observés peuvent également être dû à des effets indirects du traitement. Par exemple, les métabolites issus du thiaclopride peuvent également être investigués. Certaines études ayant déjà appuyé ce point comme étant une possible explication de la toxicité de ces molécules (Simon-Delso et al., 2015).

4.5 Etude chez le poisson-zèbre

L'absence d'effets chez le poisson-zèbre peut être expliquée par différentes raisons. En premier lieu, les récepteurs nAChRs, ne sont pas les mêmes chez tous les vertébrés et même si ils sont étudiés chez les poissons, ils pourraient avoir une affinité pour les néonicotinoïdes moindre que ceux des souris.

La méthode de prélèvement qui diffère entre les deux modèles est très probablement responsable des différences de résultats obtenus. Le système de carotte dans le cerveau de souris permet de se focaliser sur des régions précises. En revanche, chez les poissons, l'ensemble de la tête est prélevée, ce qui peut masquer d'éventuelles modifications locales.

Durant les deux premiers jours d'exposition, les larves se développent à l'intérieur d'un chorion, une enveloppe protectrice, délimitant un œuf. C'est pendant ces deux jours que se développe le système nerveux central et où il n'y a pas de barrière hématoencéphalique. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que le thiaclopride ne passe pas la barrière formée par le chorion. Cela pourrait être vérifié en sortant les larves du chorion, comme cela a déjà été fait (Sarty et al., 2017). De plus, la mise en place de la BHE au moment où la larve sort de son chorion pourrait également expliquer l'absence de résultats significatifs chez le poisson-zèbre.

Les doses utilisées se rapprochant des doses d'exposition réelles, sont des doses faibles comparativement aux études précédentes (45 μ M comme faible concentration d'exposition (Crosby et al., 2015)). Cela peut être également un facteur expliquant l'absence d'effets significatifs.

4.6 Perspectives

Cette étude s'inscrit dans un projet plus large et complet. Il est important de souligner que seules trois régions du cerveau et une dose de thiaclopride ont été investiguées chez la souris. Le gyrus cingulaire et le cervelet des individus présentés dans ce rapport pourraient apporter d'autres éléments de compréhension. Il est également important de noter que des analyses complémentaires seront réalisées sur ces mêmes régions chez des individus soumis à différentes doses.

Lors de l'euthanasie des souris, le sang, les gonades et le foie ont également été prélevés. Le cerveau est directement connecté à ces organes et des mécanismes de rétrocontrôle réciproques sont à l'œuvre. Il est donc important de remettre les résultats obtenus sur ces autres organes en relation avec ceux présentés ci-dessus afin de déterminer les liens de cause à effet entre les organes. Ainsi les impacts dans le cerveau peuvent influencer le fonctionnement du foie, et vice-versa.

Nous étudions ici un seul néonicotinoïde : le thiaclopride. Sachant que les différentes générations de molécules n'ont pas exactement les mêmes propriétés (absorption, interaction avec les récepteurs...), le travail avec d'autres molécules apporterait des données complémentaires. De la même façon, les résultats diffèrent selon l'espèce étudiée, soulignant ainsi la difficulté à définir un modèle unique et approprié dans des études de toxicologie.

5. Bibliographie

- Chen, M., Tao, L., McLean, J., and Lu, C. (2014). Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *J Agric Food Chem* 62, 6082–6090.
- Crosby, E.B., Bailey, J.M., Oliveri, A.N., and Levin, E.D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 49, 81–90.
- Fan, C.-Y., Cowden, J., Simmons, S.O., Padilla, S., and Ramabhadran, R. (2010). Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicology and Teratology* 32, 91–98.
- Gibbons, D., Morrissey, C., and Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res* 22, 103–118.
- Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., and Walsh, C.A. (1999). Doublecortin Is a Microtubule-Associated Protein and Is Expressed Widely by Migrating Neurons. *Neuron* 23, 257–271.
- Hilfiker, S., Pieribone, V.A., Czernik, A.J., Kao, H.T., Augustine, G.J., and Greengard, P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 354, 269–279.
- Hirano, T., Yanai, S., Takada, T., Yoneda, N., Omotehara, T., Kubota, N., Minami, K., Yamamoto, A., Mantani, Y., Yokoyama, T., et al. (2018). NOAEL-dose of a neonicotinoid pesticide, clothianidin, acutely induce anxiety-related behavior with human-audible vocalizations in male mice in a novel environment. *Toxicol. Lett.* 282, 57–63.
- Holgate, J.Y., and Bartlett, S.E. (2015). Early Life Stress, Nicotinic Acetylcholine Receptors and Alcohol Use Disorders. *Brain Sciences* 5, 258–274.
- Ihara, M., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V., and Sattelle, D.B. (2003). Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and *Drosophila*–chicken $SAD\beta 2$ and $ALS\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* 45, 133–144.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629–640.
- Nakayama, A., Yoshida, M., and Nagao, T. (2019). The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *Journal of Applied Toxicology* 0.
- Özdemir, S., Altun, S., Özkaraca, M., Ghosi, A., Toraman, E., and Arslan, H. (2018). Cypermethrin, chlorpyrifos, deltamethrin, and imidacloprid exposure up-regulates the mRNA and protein levels of bdnf and c-fos in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 203, 318–326.
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., et al. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int* 22, 68–102.

Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, J.-Y., and Brundin, P. (2009). Neurogenin2 Directs Granule Neuroblast Production and Amplification while NeuroD1 Specifies Neuronal Fate during Hippocampal Neurogenesis. *PLOS ONE* *4*, e4779.

Sarty, K.I., Cowie, A., and Martyniuk, C.J. (2017). The legacy pesticide dieldrin acts as a teratogen and alters the expression of dopamine transporter and dopamine receptor 2a in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* *194*, 37–47.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., et al. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res* *22*, 5–34.

Soares, J.C., Pereira, T., Costa, K.M., Maraschin, T., Basso, N.R., and Bogo, M.R. (2017). Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Colloids Surf B Biointerfaces* *157*, 335–346.

Terayama, H., Endo, H., Tsukamoto, H., Matsumoto, K., Umezu, M., Kanazawa, T., Ito, M., Sato, T., Naito, M., Kawakami, S., et al. (2016). Acetamiprid Accumulates in Different Amounts in Murine Brain Regions. *Int J Environ Res Public Health* *13*.

Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *45*, 247–268.

Tomizawa, M., Lee, D.L., and Casida, J.E. (2000). Neonicotinoid Insecticides: Molecular Features Conferring Selectivity for Insect versus Mammalian Nicotinic Receptors. *J. Agric. Food Chem.* *48*, 6016–6024.

U.S. Environment Protection Agency, Office of Pesticide Programs. Fact sheet thiacloprid 2003,7501C

Venables, M.J., Navarro-Martín, L., Basak, A., Baum, B.R., Zhang, D., and Trudeau, V.L. (2016). Characterization of multiple nestin isoforms in the goldfish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* *19*, 8–17.



Diplôme :
Spécialité : Coursus Ingénieur agronome
Spécialisation / option : BMC (Biologie Cellulaire et Moléculaire)
Enseignant référent : FRASLIN Jean-Marc

Auteur(s) : de l'ESTOILE Valentine	Organisme d'accueil : IRSET, équipe 6, axe 2
Date de naissance* : 14/04/1996	Adresse :
Nb pages : 23 Annexe(s) : 0	9 rue du professeur Léon Bernard
Année de soutenance : 2019	35 000 Rennes
	Maître de stage : CHARLIER Thierry

Titre français : Effets des néonicotinoïdes sur la neuroplasticité
Titre anglais : Effets of neonicotinoides on neuroplasticity

Résumé (1600 caractères maximum) :

L'utilisation toujours plus importante des néonicotinoïdes, des insecticides ciblant les récepteurs nicotiniques des insectes, crée des interrogations sur leurs effets potentiels chez les vertébrés. En effet, les récepteurs nicotiniques sont présents dans le système nerveux central et jouent un rôle important dans différentes fonctions majeures. Dans cette étude, nous étudions l'effet du thiaclopride sur la plasticité neuronale dans les modèles murin et poisson-zèbre. Dans un premier temps, des larves de poisson-zèbre ont été exposées du 1^{er} au 6^{ème} jour post-fertilisation à 10-6 M, 10-7 M ou 10-8 M de thiaclopride. L'ensemble des têtes a été analysé par RT-qPCR en utilisant des marqueurs neuroendocriniens (Er α , Er β 1 et Er β 2 et Aromatase), de différenciation et de prolifération (PCNA, neurogenine et nestine) et synaptiques (synaptophysine, synapsine IIa et BDNF). En parallèle, des souris gestantes ont été gavées, du jour 6 au jour 15 de gestation, avec 6mg/kg/jours de thiaclopride. Les portées ont été euthanasiées à 35 jours et l'hippocampe, l'hypothalamus et les amygdales ont été prélevées et investiguées par RT-qPCR avec les mêmes marqueurs, en ajoutant DCX (doublecortine). Nous avons observés des effets significatifs sur les marqueurs prolifératifs et synaptiques chez la souris, alors que les larves n'étaient pas affectées, témoignant d'un effet du thiaclopride chez les vertébrés.

Abstract (1600 caractères maximum) :

The extensive use of neonicotinoids, a class of widely used insecticides targeting the insect nicotinic receptors of the cholinergic system, raises concerns over its potential adverse effects in vertebrates. Indeed, the nicotinic receptors are widely distributed in the vertebrate peripheral and central nervous systems and play fundamental functions during development. In this study, we investigated the effects of a neonicotinoid: thiacloprid on central nervous system in parallel in zebrafish and mouse models. We exposed zebrafish larvae from 1 day post fertilization (dpf) to 6 dpf to 10-6 M, 10-7 M or 10-8 M thiacloprid. Whole heads were analyzed by RT-qPCR for endocrine (estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta1 and beta2 and aromatase), proliferative (PCNA, neurogenin) and synaptic (synaptophysin, synapsin IIa and BDNF) markers. Then, we treated mice during gestation, from embryonic day 6 to 15 with 6mg/kg/day of thiacloprid via ingestion. 35 days old male and female offspring were euthanized and hippocampus, hypothalamus and amygdala were investigated for the expression of the same endocrine, proliferative and synaptic markers as those used in fish. We also analyzed the neuronal marker DCX (doublecortin). In the fish, the exposition to thiacloprid did not affect any of the markers. In mouse offspring, several markers were significantly affected in different brain areas.

Mots-clés : thiaclopride, poissons-zèbre, souris, neurogènese, récepteurs aux œstrogènes, hippocampe, hypothalamus, amygdale

Key Words : thiacloprid, zebrafish, mouse, neurogenesis, oestrogen receptor, hippocampus, hypothalamus, amygdala

