

## Impact de l'ingestion chronique de glufosinate d'ammonium sur le fonctionnement du système nerveux central.

S. MEME<sup>a\*</sup>, C. MONTECOT<sup>b\*</sup>, G. CALAS<sup>b</sup>, O. RICHARD<sup>b</sup>, H. GAUTIER<sup>b</sup>, T. GEFFLAUT<sup>c</sup>, J.C. BELOEIL<sup>a</sup>, J. PICHON<sup>b</sup>, W. MEME<sup>b</sup>.

\* Co-premiers auteurs

<sup>a</sup>Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France.

<sup>b</sup>Laboratoire de Neurobiologie, Université d'Orléans, France.

<sup>c</sup>Synthèse et étude de systèmes à intérêt biologique UMR 6504, Clermont Ferrand, France.

### **A- INTRODUCTION- CONTEXTE**

L'activité économique des cinquante dernières années a conduit à la mise en place progressive d'une utilisation massive de produits phytosanitaires pour améliorer les rendements agricoles. Les effets de ces produits sur la santé animale et humaine préoccupent de plus en plus le citoyen et le consommateur des pays occidentaux depuis quelques années. Les intoxications aiguës par les pesticides peuvent affecter le système nerveux central et le système nerveux périphérique des animaux et des humains et se manifestent généralement par des crises convulsives ou bien des céphalées. Certains pesticides comme les organophosphorés ont d'ailleurs été conçus pour endommager le fonctionnement du système nerveux des insectes dits « ravageurs » ou pour perturber le métabolisme de plantes indésirables. Du fait des similitudes de fonctionnement du système nerveux des insectes et des mammifères, d'une part, et de l'existence de réactions métaboliques communes entre végétaux et animaux, d'autre part, ces pesticides présentent un risque neurotoxique potentiel pour l'Homme. Les agriculteurs sont particulièrement exposés aux pesticides et représentent, par conséquent, une population à haut risque en termes de santé publique. Les études épidémiologiques révèlent que ces travailleurs agricoles exposés pendant de nombreuses années aux pesticides et plus particulièrement aux organophosphorés ont développé des troubles neuropsychologiques au niveau de la mémoire, de l'attention et de l'anxiété (Farahat et coll., 2003; Roldan-Tapia et coll., 2006) et qu'ils ont 5,6 fois plus de risques de développer la maladie de Parkinson et 2,3 fois la maladie d'Alzheimer (Baldi et coll., 2003). La neurotoxicité des pesticides n'est pas seulement inquiétante pour les personnes exposées dans le cadre de l'exercice de leur profession mais aussi pour l'ensemble de la population. En effet, selon un rapport de la Direction Générale de la Santé et de la Consommation de la Commission Européenne publié en 2008, indique qu'en France, 48% des fruits et légumes sont contaminés. L'autorisation de cultiver des plantes transgéniques résistantes aux herbicides ou aux insecticides risque d'accroître encore ce chiffre. En 2004, le caractère de tolérance aux herbicides a été développé sur des semences de soja, maïs et coton dont les cultures couvraient 71% de la superficie totale cultivée en organismes génétiquement modifiés (OGMs). Le risque majeur de ce type de culture réside dans le fait que l'homme et le bétail ingèrent des doses croissantes d'herbicides. En dépit de leur omniprésence dans l'environnement, leur impact sur la santé reste encore difficile à mesurer. Il est alors indispensable d'évaluer précisément et de la façon la plus exhaustive possible les paramètres toxicologiques des produits qui constituent les herbicides. Dans ce contexte extrêmement sensible, nous nous sommes intéressés aux effets neurotoxiques du composé actif d'un herbicide à large spectre couramment utilisé dans un grand nombre de secteurs agricoles (arboriculture, viticulture, céréaliculture et horticulture) à travers le monde: le glufosinate d'ammonium (GLA). Le GLA est un sel d'ammonium de la phosphinothricine (PPT) qui a pour cible la glutamine synthétase des plantes. Cette enzyme est extrêmement conservée dans le monde vivant puisqu'on la retrouve chez les mammifères où elle intervient, entre autres, au niveau du système nerveux central, dans la régulation des pools de neurotransmetteurs tels que le GABA et le glutamate. L'ingestion de PPT, sous la forme herbicide, involontaire ou lors de tentatives de suicide, peut provoquer des convulsions ainsi qu'une amnésie sévère. Le risque d'exposition accrue et le développement de plantes transgéniques résistantes à cet herbicide nous ont conduits à étudier les risques neurotoxiques liés à une exposition chronique à faibles doses de PPT ou de sa forme acétylée qui est produite chez les plantes OGMs résistantes à cet herbicide. En effet, nous savons que des plantes résistantes à la PPT, transforment la PPT en PPT N-acétylée (NAPPT). La forme acétylée de la PPT ne possède alors plus la propriété d'inhiber la glutamine synthétase et n'est donc pas toxique pour la plante. Mais, pour autant, rien ne démontre, dans l'état actuel de nos connaissances, l'innocuité de la NAPPT pour les animaux et l'Homme. La première étape de ce projet a consisté en la préparation des molécules nécessaires à l'étude neurotoxique : la D, L-PPT (sous sa forme racémique) mais aussi sous ses deux formes optiquement pures (L et D), la N-acétyl-PPT (NAPPT) et autres métabolites retrouvés dans les plantes transgéniques (PPTO, PPTOH, MPA, MPP). Dans une première partie de cette étude, nous avons voulu déterminer les effets neurotoxiques chez des souris d'un traitement chronique de plusieurs semaines au PPT et à la NAPPT. Nous avons évalué l'apprentissage spatial, l'anxiété, l'activité locomotrice en utilisant toute une batterie de tests comportementaux. Nous avons ensuite recherché si le traitement chronique induit des modifications de structure du tissu cérébral par analyse de texture des images IRM. L'exposition chronique des animaux à la PPT, inhibiteur de la Glutamine Synthétase (GlnS), laisse supposer que le cycle GABA-glutamate-glutamine est perturbé. Pour vérifier ce point, le métabolisme cérébral a été étudié par Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) permettant de quantifier le glutamate, le GABA et la glutamine in vivo, et par des mesures ex-vivo de l'activité enzymatique de la GlnS. Lors d'une étude histologique, nous avons recherché si ce traitement chronique induisait une mort neuronale et/ou une astrogliose qui est considérée comme un marqueur précoce d'une neurotoxicité. En parallèle, une étude électrophysiologique a été réalisée afin de déterminer si la PPT, analogue

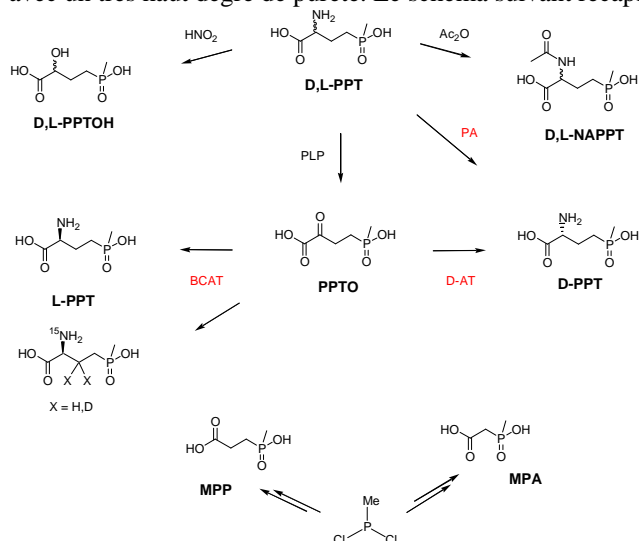
structural du glutamate, induit une modification de l'activité neuronale qui serait responsable des effets convulsivants observés lors d'une intoxication aigüe.

## **B- MATERIELS ET METHODES**

### **1. Synthèse de la PPT et de métabolites de la PPT**

Nous avons eu pour objectif la préparation des molécules nécessaires au développement du projet : tout d'abord la D, L-PPT (sous sa forme racémique) mais aussi sous ses deux formes optiquement pures (L et D). La synthèse des métabolites de la PPT a également constitué une de nos tâches, en particulier la N-acétyl-PPT (NAPPT) formée au sein des organismes transgéniques résistants à la PPT. Plusieurs métabolites issus de réactions d'oxydation ou de décarboxylation de la PPT (PPTO, PPTOH, MPA, MPP) ont aussi fait l'objet de nos travaux. Enfin, nous avons envisagé le marquage isotopique de la PPT.

Plusieurs dérivés ont pu être préparés à partir de la D,L-PPT racémique que nous avons purifiée et isolée en grande quantité à partir d'une formulation d'herbicide commerciale. Ainsi, la NAPPT, le PPTO et le PPTOH ont été obtenus respectivement par acétylation, oxydation et désamination nitreuse de la PPT. Les deux énantiomères D et L de la PPT ont été préparés à partir du PPTO par transamination enzymatique en utilisant soit une L-aminotransférase (la BCAT d'*E. coli*), soit une D-aminotransférase (D-AT). Nous avons aussi pu obtenir la D-PPT via un dédoublement cinétique de la PPT racémique en utilisant la pénicilline acylase (PA). Le procédé chimioenzymatique que nous avons développé permet d'incorporer différents isotopes dans la structure de la PPT : nous avons ainsi préparé de la L-<sup>15</sup>N-PPT et la L-PPT marquée par du deutérium. Ce procédé peut permettre aussi l'incorporation de tritium à la molécule. Enfin 2 métabolites ont pu être préparés par synthèse chimique à partir d'un produit commercial (MePCl<sub>2</sub>). Toutes les molécules ont été purifiées, totalement caractérisées (RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, spectrométrie de masse, analyses élémentaires) et isolées avec un très haut degré de pureté. Le schéma suivant récapitule l'ensemble des molécules qui ont été préparées.



**Fig. 1 :** Ensemble de molécules préparées dans le cadre de l'étude.

### **2. Traitements chroniques**

Des souris mâles de la lignée C57BL/6J ont été divisées en 4 groupes expérimentaux d'au moins 13 individus chacun. Le traitement chronique débute dès que les souris atteignent l'âge de 10 semaines. Les groupes traités par sont injectés 3 fois par semaine avec une dose de la PPT (2,5 ; 5 ou 10 mg/kg) ou de la NaPPT (10mg/kg) dissous dans 0,9% de NaCl pendant 10 semaines. Le volume d'injection est de 5 µL/g pour toutes les doses. Les animaux contrôles ont reçu une injection i.p. d'un volume comparable de sérum physiologique. Chaque semaine, les animaux sont pesés.

### **3. Tests comportementaux**

Suite à ce traitement chronique, nous avons évalué tout d'abord les capacités mnésiques des souris. Après traitement chronique à la PPT ou à la NAPPT, les souris ont été soumises à un test d'apprentissage dans un labyrinthe radiaire. Il s'agit d'un test d'orientation spatiale et de capacité d'apprentissage avec l'intégration de la notion de récompense. Ce test a été suivi de toute une série d'autres tests afin d'évaluer des modifications de l'anxiété par le test du labyrinthe en croix surélevé (Plus maze) et d'éventuelles incapacités motrices qui biaiserait les résultats du test du labyrinthe radial : l'activité motrice (test de l'open-field), la force musculaire (test de traction) et l'équilibre (test du rota-rod) de l'animal.

### **4. Etude IRM**

Plusieurs régions particulières (ROI) ont été choisies afin d'être analysées en texture à l'aide du logiciel d'analyse de texture (ImaIRM) développé au laboratoire et comportant plusieurs méthodes d'analyse comme les matrices de cooccurrence, matrices de longueurs de plages, matrices des gradients ainsi que l'histogramme des niveaux de gris. A l'issue de ces analyses chaque ROI est caractérisée par son propre profil de texture défini par un total de 51 paramètres

de texture. L'étape suivante consiste alors à comparer les profils de texture ainsi obtenus par des méthodes statistiques multiparamétriques

Une première série d'acquisition d'images IRM a été effectuée afin de comparer la texture de plusieurs régions cérébrales chez les souris non traitées, traitées aux doses de 2,5 et 5mg/kg de PPT. Des analyses statistiques multiparamétriques (Classification Ascendante Hiérarchique et l'Analyse Factorielle des Correspondances) ont ainsi été réalisées afin de comparer les profils de texture de ces régions. 10 structures cérébrales ont été étudiées : la capsule interne, le cortex auditif, moteur, somatosensoriel, piriforme, visuel, le thalamus, le striatum, l'hippocampe et le tractus pyramidal.

### 5. Etude SRM

Une ROI a été sélectionnée (voxel 3\*3\*3mm) centrée sur l'hippocampe afin de réaliser un spectre 1H à l'aide d'une séquence de type PRESS d'une durée de 8min. Les spectres RMN 1H ont été quantifiés avec le logiciel JMRUI3.0 afin de déterminer les concentrations en métabolites cérébraux (N-acetyl aspartate, glutamate, glutamine, créatine, choline, taurine, myo-inositol, GABA).

### 6. Dosages biochimiques : Etude de la glutamine synthétase

L'activité de la glutamine synthétase a été mesurée sur des fragments de cortex, de cervelet et d'hippocampe du cerveau de chaque animal. La détermination photométrique de l'activité de la GlnS est fondée sur la formation du complexe L- $\gamma$ -glutamyl-hydroxamate chlorure ferrique.

L'activité de la GlnS est exprimée en mM de  $\gamma$ -glutamyl-hydroxamate formé par h par mg de protéines à 37 °C.

### 7. Immuno-histologie

Après fixation par perfusion intracardiaque au paraformaldéhyde à 4% dans un tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4), les cerveaux sont prélevés, post-fixés, puis cryoprotégés (sucrose 30%). Neuf coupes coronales de 20  $\mu$ m d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20 °C aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : -0,7 mm; -1,22 mm; -1,94 mm; -2,92 mm et -4,16 mm du bregma selon l'atlas du cerveau de la souris de Paxinos et Franklin (Paxinos et Franklin, 2001).

Immunomarquage de la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) : La détection des astrocytes s'effectue par immunomarquage de la protéine GFAP qui est une protéine constitutive des filaments intermédiaires des astrocytes. Une préincubation dans une solution de PBS+ contenant du PBS, 0,15% de Triton X-100, 1% de BSA et 0,4% de sérum de chèvre bloquant est réalisée pendant 45 minutes. Chaque coupe est ensuite incubée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-GFAP (Dako, Trappes, France) dilué au 1/500<sup>e</sup> dans la solution PBS+ sans BSA pendant la nuit à 4°C. Après lavage au PBS, les coupes sont incubées 1 h avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, Sigma) dilué au 1/100<sup>e</sup> dans du PBS. Après lavage avec du PBS et BSA 0,1%, les coupes sont montées avec du Mowiol 4-88 (Fluka, Paris, France). Le comptage de ces cellules est réalisé dans 7 structures : l'hippocampe, le cortex moteur, le cortex somato-sensoriel, le cortex visuel, le cortex auditif, le thalamus, le striatum. Pour chaque niveau de coupe, les cellules GFAP positives sont comptées dans un nombre fixe (2 à 6 suivant la taille de la structure) de carrés (200x200  $\mu$ m<sup>2</sup>). Les densités de cellules GFAP-positives (nombre de cellules/mm<sup>2</sup>) ainsi obtenues sont ensuite moyennées sur l'ensemble des niveaux de coupes.

Coloration au violet de Crésyl : Une coloration classique au violet de crésyl est effectuée afin d'observer d'éventuelles morts neuronales au niveau de l'hippocampe sur des coupes de niveau -1.94 mm du bregma chez des souris témoins et des souris traitées à la PPT à la dose de 10 mg/kg .

### 8. Electrophysiologie

Deux types de préparations ont été utilisées : des co-cultures d'astrocytes et de neurones issus du cortex de souris embryonnaires et nouveau-nés et des tranches de cerveau issues de souris de 15 à 21 jours. La technique de patch-clamp dans la configuration cellule entière a été utilisée pour enregistrer l'activité spontanée et l'activité déclenchée de réseau des neurones et leurs modifications en présence de PTT.

## C- RESULTATS

Tout au long des 10 semaines de traitements chroniques, le poids de chaque souris a été relevé une fois par semaine. Les traitements réalisés n'entraînent pas de mortalité significativement différente de la normale. Il n'y a pas de modification pondérale significative dans et entre les différents lots de souris.

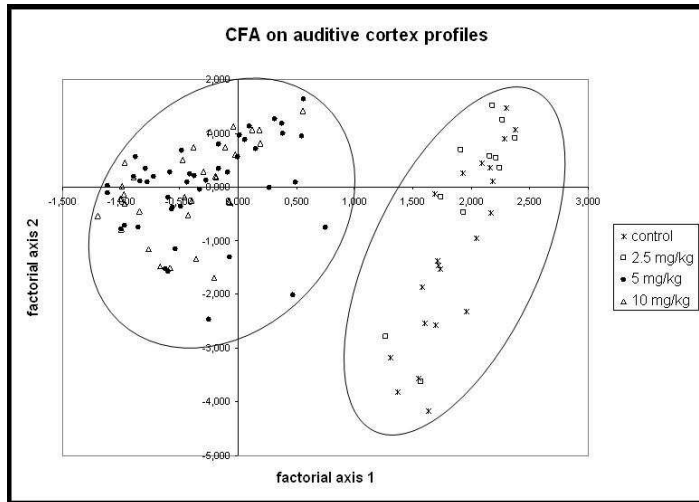
### 1. Tests comportementaux

Les souris témoins et celles traitées par la NAPPT et le PPT à la plus faible dose apprennent la disposition des récompenses, ce qui n'est pas le cas pour les souris traitées par les plus fortes doses de PPT. Les résultats obtenus avec le labyrinthe radiaire témoignent d'un déficit modéré de mémorisation des souris traitées par le PPT aux doses de 5 et 10 mg/kg.

Suite aux tests de traction, du rotarod, et de l'open-field aucune souris n'a présenté de troubles moteurs et/ou d'équilibre. Pour le test de l'anxiété, il n'existe aucune différence significative entre les souris traitées par le PPT et la NAPPT et les souris témoins.

### 2. Etude IRM

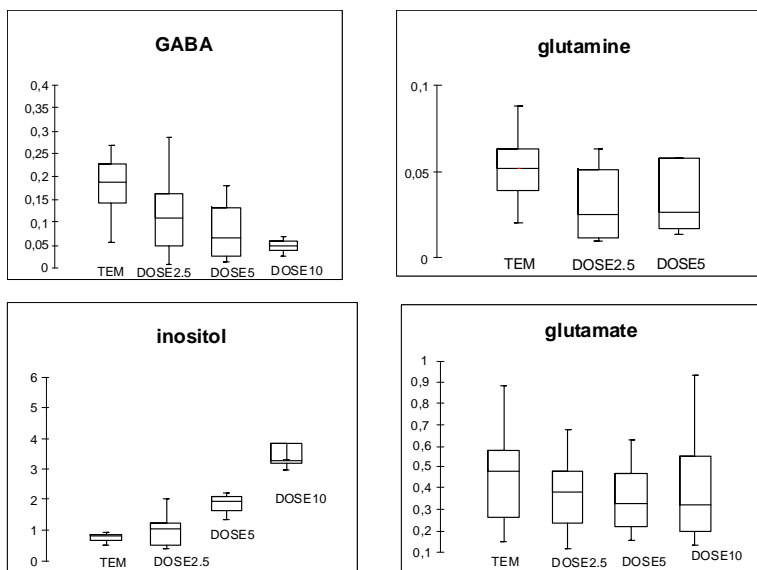
L'analyse de texture a permis de mettre en évidence un effet de dose entre 2.5mg/kg et 5 mg/kg pour laquelle des modifications de texture sont détectables par IRM couplée à l'analyse de texture. Pour l'hippocampe et le cortex somatosensoriel ces modifications de structure sont visibles dès 2.5mg/kg.



**Fig. 2 :** Analyse Factorielle des Correspondances permettant de comparer les profils de texture des souris soumises à différentes doses de PPT.

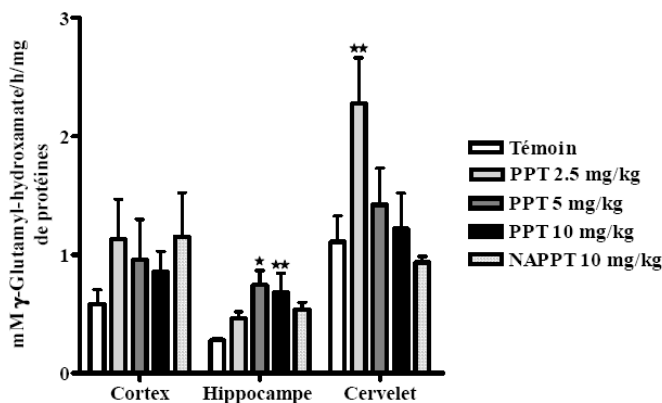
### 3. Etude SRM

La quantification des spectres RMN 1H par l'intégration des pics de chaque métabolite met en évidence : une augmentation du myo-inositol ainsi qu'une diminution du GABA en présence de PPT (5 - 10mg/kg). Aucune différence significative de concentration pour les autres métabolites n'a été mise en évidence suite au traitement chronique des souris à la PPT.



**Fig. 3** Quantification des métabolites dans l'hippocampe pour les souris témoins et les souris soumises à différentes doses de PPT.

### 4. Dosage enzymatique de la glutamine synthétase



**Fig. 4:** Evolution de l'activité de la GlnS dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet après un traitement chronique i.p. des souris C57BL/6J par du PPT aux doses de 2,5; 5 et 10 mg/kg et de la NAPPT à la dose de 10 mg/kg. n = 16; 6; 6;

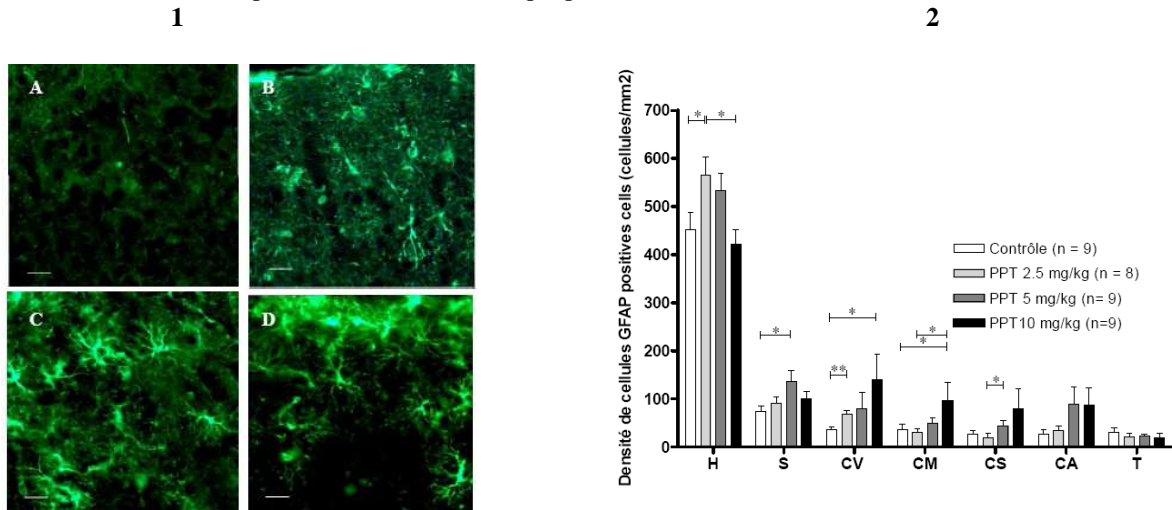
10; 8 respectivement pour les témoins, les souris traitées au PPT 2,5; 5 et 10 mg/kg et au NAPPT 10 mg/kg (ANOVA suivi d'un test de Dunnet, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Dans le cervelet, le traitement par le PPT 2,5 mg/kg entraîne une augmentation significative de 105% de l'activité de la GlnS et dans l'hippocampe, le traitement par le PPT aux doses de 5 et 10 mg/kg entraîne une augmentation significative de 168% et 146% respectivement.

### 5. Etude immuno-histologique

L'étude histologique après coloration au violet de crésyl, ne montre pas de dommages neuronaux après un traitement chronique à la dose de 10 mg/kg.

Parmi les sept structures étudiées, cinq (l'hippocampe, le cortex moteur, le cortex somato-sensoriel, le cortex visuel, le striatum) montrent une augmentation significative de la densité des cellules marquées par les anticorps fluorescents anti-GFAP après un traitement chronique par la PPT.



**Fig. 5 :** Photographies représentatives de la densité des cellules GFAP-positives au niveau du cortex moteur après le traitement par du sérum physiologique (A), par du PPT à la dose de 2.5 mg/kg (B), 5 mg/kg, 10 mg/kg, 3 fois par semaine pendant 10 semaines. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m.

Figure 2: Densité de cellules GFAP-positives dans différentes structures cérébrales : (H : hippocampe, S : striatum, CV : cortex visuel, CM : cortex moteur, CS : cortex somato-sensoriel, CA : cortex auditif, T : Thalamus) Les résultats sont exprimés en cellules /mm<sup>2</sup> ± SEM (\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ).

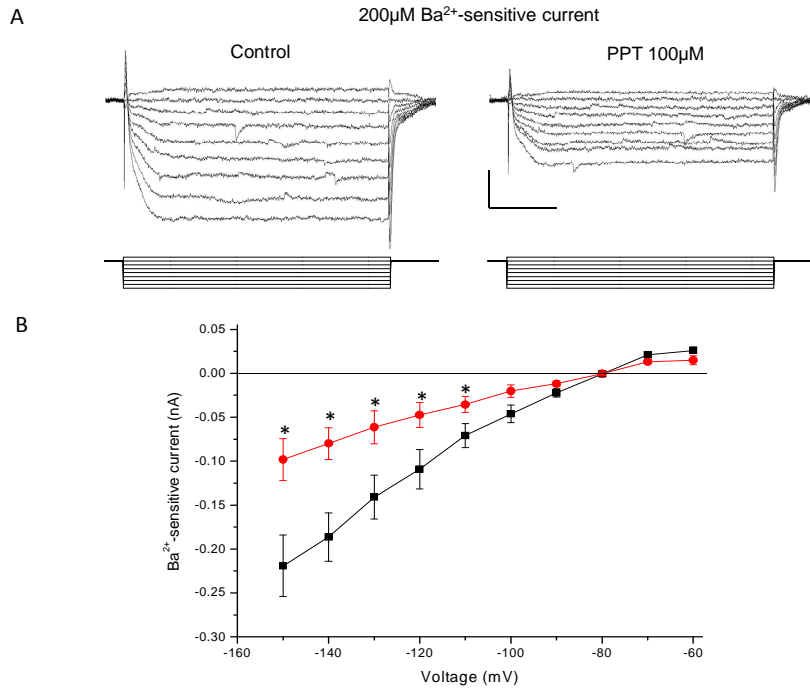
### 6. Electrophysiologie

Nous avons centré nos investigations sur deux axes :

1. l'étude de l'activité de réseau des neurones par des enregistrements de l'activité spontanée neuronale
2. l'étude des propriétés électriques intrinsèques par des enregistrements de l'activité déclenchée

Les enregistrements obtenus montrent que la PPT (100  $\mu$ M) modifie l'activité de réseau des neurones. Nous avons pu classer nos résultats selon deux profils bien distincts. En effet, la PPT est capable sur certaines cellules d'augmenter la fréquence des potentiels d'action et de modifier le mode de fréquence (plus irrégulière, apparition de bouffées de potentiels d'action). A l'opposé de cet effet, la PPT peut induire une diminution pouvant aboutir à une complète disparition de l'activité électrique neuronale. De façon intéressante, l'application de glutamine (200 $\mu$ M) a parfois permis de rétablir l'activité électrique inhibée par la PPT.

En parallèle de ces modifications de l'activité de réseau, les résultats obtenus montrent que la PPT modifie un paramètre de façon constante : le seuil de déclenchement des potentiels d'action (diminution de la rhéobase). En effet, pour un choc de même amplitude, les neurones soumis à la PPT génèrent plus rapidement ou plus de potentiels d'action que lorsqu'ils sont enregistrés en conditions contrôles. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la PPT augmente de façon significative l'amplitude et la durée de la phase de posthyperpolarisation des potentiels d'action, phase dépendante des courants potassiques. De plus, les mêmes résultats ont également été obtenus lors des enregistrements réalisés sur des neurones en co-cultures avec des astrocytes. Ces co-cultures ne présentant pas ou très peu d'activité GlnS, l'ensemble de ces données convergent vers un effet direct de la PPT sur les propriétés intrinsèques des neurones. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude sur les courants ioniques montrant que la PPT inhibe de façon spécifique les courants potassiques à rectification entrante (Kir) (figure) qui jouent un rôle majeur dans le maintien du potentiel de membrane et le seuil de déclenchement des potentiels d'action. Par conséquent, les effets neurotoxiques et convulsivants de la PPT pourraient être expliqués par l'inhibition des courants Kir.



**Fig. 6 :** effets de la PPT sur les courants potassiques à rectification entrante (Kir)

**A.** Illustration des effets de la PPT 100µM sur la relation courant-voltage des courants sensibles au Ba<sup>2+</sup> dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Le potentiel imposé de -70mV est diminué par des sauts de créneaux de 10 mV jusqu'à -150mV (échelle : 0.1nA, 100ms). **B.** Effets de la PPT 100µM (courbe rouge) sur la relation courant-voltage des courants sensibles au Ba<sup>2+</sup> à l'état stable (\*) p<0.05 (n=5) test de Wilcoxon.

#### **D- CONCLUSION GENERALE**

Nous avons évalué les effets neurotoxiques d'un traitement chronique à faibles doses de PPT. Les souris traitées au PPT pendant 10 semaines à la dose de 5 et 10mg/kg 3 fois par semaine pendant 10 semaines montrent un léger déficit d'apprentissage spatial observé dans le test du labyrinthe radiaire. Par ailleurs, l'étude IRM montre que chez ces souris l'hippocampe est altéré au niveau de sa structure. Les modifications structurales de l'hippocampe révélées par l'analyse de texture suite aux traitements par le PPT pourraient résulter de changements métaboliques dans les neurones et/ou les astrocytes. Ces modifications sont corrélées avec l'analyse métabolique de la GlnS et avec les résultats des tests comportementaux sur la mémoire qui témoignent d'une altération fonctionnelle de l'hippocampe. De plus nous avons montré que la PPT inhibe les courants potassiques à rectification entrante (Kir) neuronaux qui ont un rôle majeur dans le maintien du potentiel de membrane et le seuil de déclenchement des potentiels d'action. L'inactivation des courants Kir a pu être liée à des phénomènes de mort cellulaire et de lésions structurales. Par conséquent, les effets neurotoxiques de la PPT pourraient en partie induits par l'inhibition des courants Kir.

A notre connaissance, notre étude est la première, à montrer qu'une exposition chronique à faible dose de PPT induit des altérations cérébrales. En parallèle nous avons étudié les effets du PPT modifié par les plantes transgéniques résistantes à cet herbicide, c'est-à-dire sa forme acétylée (le NAPPT). Nous n'observons aucun effet d'un traitement chronique par cette molécule. Cependant, on peut s'interroger sur les risques d'un clivage de la NAPPT par les désacetylases endogènes des organismes consommateurs de ces OGMs, régénérant ainsi le PPT potentiellement neurotoxique.

Nous montrons clairement que la PPT est neuroactif même à faible dose mais il est difficile de déterminer si l'exposition chronique à cette molécule peut conduire au développement de neuropathologies plus ou moins invalidantes dans les populations susceptibles d'être en contact avec cet herbicide. Comme tout modèle expérimental, le traitement chronique par voie intrapéritonéale présente des inconvénients. En effet il est difficile de transposer nos résultats à une exposition chronique des consommateurs et surtout des utilisateurs professionnels de cet herbicide qui sont exposés par voie respiratoire, digestive et cutanée. Pour mimer avec plus de réalisme, la contamination de ces personnes, nous envisageons un traitement par voie orale ou par inhalation. L'OMS a défini une dose quotidienne acceptable (ou Acceptable Daily Intake, ADI) de PPT pour l'homme à 0,02 mg/kg. Cette valeur est calculée à partir de la plus grande dose pour laquelle aucun effet n'est observé (No Observe Adverse Effect Level, NOAEL) chez la souris (11 mg/kg/jour) et le rat (2,1 mg/kg/jour).

La plus petite dose est choisie. Un facteur de sécurité de 100 lui est appliqué afin d'établir l'ADI pour l'homme (soit 0.02 mg/kg/jour). Notre étude des conséquences métaboliques, comportementales, histologiques et de texture a mis en évidence un effet du PPT à des doses moindres que celles utilisées lors des études de l'OMS. En effet, une dose de 10 mg/kg, trois fois par semaine, correspond à un traitement quotidien par 4,3 mg/kg/jour, 5 mg/kg à 2,1 mg/kg/jour et 2,5 mg/kg à 1,1 mg/kg/jour. Comme les premiers effets apparaissent dès la dose de 5 mg/kg, le NOAEL de nos travaux correspond donc à 2,5 mg/kg soit 1,1 mg/kg/jour. Cette valeur est exactement 10 fois plus faible que celle trouvée, pour la souris, dans les études de l'OMS. Il est concevable qu'une étude similaire menée chez le rat démontre un effet du PPT pour une dose également beaucoup plus faible. Ainsi, l'ADI du PPT établi par l'OMS serait jusqu'à 10 fois trop élevé. Nous avons bien évidemment parfaitement conscience du fait que ces extrapolations comptables des traitements i.p. à des traitements par voie orale ne sont pas directement comparables. Néanmoins, de telles considérations permettent de s'interroger quant aux procédures d'évaluation de la toxicité d'une telle molécule.

### **E- PERSPECTIVES**

Les périodes pré et post-natales étant les périodes les plus sensibles aux contaminations par des xénobiotiques nous avons décidé d'étudier l'impact sur le développement précoce du système nerveux d'une exposition au PPT, lors du développement embryonnaire. L'équipe du laboratoire de neurobiologie recherchera les conséquences comportementales et histologiques (neurogenèse, astrocytose, mort neuronale....) d'une exposition prénatale à la PPT. Ces travaux seront effectués en collaboration avec S. Mortaud (Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique Expérimentales & Moléculaires, CNRS et Université d'Orléans) dans le cadre du projet ANR neuropest 2010-2013.

### **F- ARTICLES PUBLIES DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE**

- ✓ Calas G., Richard O., Mème S., Beloeil J.C., Doan B.T., Gefflaut T., Mème W., Crusio W., Pichon J., Montécot C. (2008) Chronic exposure to glufosinate-ammonium induces spatial memory impairments, hippocampal MRI modifications and glutamine synthetase activation in mice. *Neurotoxicology* 29(4):740-7.
- ✓ S. Mème\*, G. Calas\*, C. Montécot, O. Richard, H. Gautier, T. Gefflaut, B.T. Doan, W. Mème, J. Pichon, J.C. Beloeil. (2009) MRI characterization of structural mouse brain changes in response to chronic exposure to the glufosinate ammonium herbicide. *Toxicological Sciences* 111(2):321-330.

### **G- ARTICLES EN PRÉPARATION**

- ✓ S. Mème et al., In vivo MRS study in mice to evaluate metabolism impairment after glufosinate ammonium treatment.
- ✓ H. Gautier et al., Convulsivant herbicide induces changes in neuronal activity through inhibition of inwardly rectified potassium current.

### **H- THESE**

A. Calas : Neurotoxicités du principe actif d'un herbicide à large spectre, le glufosinate d'ammonium, chez la souris. Soutenue le 12 décembre 2008 (J.L. Pichon Directeur, C. Dubourg encadrante), Bourse régionale (Région Centre)

### **I- BIBLIOGRAPHIE**

- ✓ Baldi, I., P. Lebaillly, B. Mohammed-Brahim, L. Letenneur, J. F. Dartigues et P. Brochard (2003). "Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly." *Am J Epidemiol* 157(5): 409-14.
- ✓ Farahat, T. M., G. M. Abdelrasoul, M. M. Amr, M. M. Shebl, F. M. Farahat et W. K. Anger (2003). "Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides." *Occup Environ Med* 60(4): 279-86.
- ✓ Roldan-Tapia, L., F. A. Nieto-Escamez, E. M. del Aguila, F. Laynez, T. Parron et F. Sanchez-Santed (2006). "Neuropsychological sequelae from acute poisoning and long-term exposure to carbamate and organophosphate pesticides." *Neurotoxicol Teratol* 28(6): 694-703