

NTT : 2016SACLS054

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'INSTITUT DE RADIOPROTECTION ET DE SURETÉ
NUCLÉAIRE

ÉCOLE DOCTORALE N° 569 ITFA
Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué
Toxicologie

Par

Marie Legrand

Rôle de la neurogenèse au cours du développement dans les troubles
comportementaux induits par l'uranium

Thèse présentée et soutenue à l'IRSN Fontenay-aux-roses, le 31 mars 2016 :

Composition du Jury :

Pr Abrous Nora	Université de Bordeaux	Rapporteur
Pr Benotmane Rafi	Belgian Nuclear Research Center (Belgique)	Rapporteur
Pr Coudoré François	Université Paris Saclay	Président du jury
Dr Vidaud Claude	Commissariat à l'énergie atomique	Examinatrice
Pr Eriksson Per	Upsalla University (Suède)	Directeur de thèse
Dr Dinocourt Céline	Institut de radioprotection et de sureté nucléaire	Tutrice

Sommaire

Liste des abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Avant-propos	13
1 Introduction	14
1.1 L'uranium	14
1.1.1 Découverte historique	14
1.1.2 Caractéristiques	14
1.1.2.1 Propriétés physico-chimiques	14
1.1.2.2 Propriétés radiologiques	15
1.1.3 Utilisations de l'uranium	15
1.1.3.1 Enrichissement de l'uranium	15
1.1.3.2 L'uranium appauvri	17
1.1.4 Sources d'exposition	17
1.1.4.1 Expositions naturelles	17
1.1.4.2 Expositions dues aux activités humaines	18
1.1.5 Biocinétique de l'uranium	18
1.1.6 Toxicité de l'uranium	20
1.1.6.1 Toxicité de l'uranium sur les principaux organes cibles	20
1.1.6.1.1 Les reins	20
1.1.6.1.2 Les os	22
1.1.6.2 Toxicité de l'uranium sur les autres organes	23
1.1.6.2.1 Les poumons	23
1.1.6.2.2 Le cœur	23
1.1.6.2.3 Le foie	23
1.1.6.2.4 Le cerveau	24
1.1.7 Reprotoxicité de l'uranium	24
1.1.7.1 Effets sur les paramètres reproducteurs	24
1.1.7.2 Toxicité sur les femelles gestantes	25
1.1.7.3 Toxicités prénatale et postnatale	26

1.1.7.4	Passage placentaire de l'uranium	27
1.1.8	Neurotoxicité de l'uranium	27
1.1.8.1	Accumulation de l'uranium dans le cerveau	28
1.1.8.1.1	Cerveau entier	28
1.1.8.1.2	Structures cérébrales	28
1.1.8.2	Mécanismes de passage de l'uranium dans le cerveau	29
1.1.8.3	L'uranium et troubles des fonctions cérébrales	30
1.1.8.3.1	Études épidémiologiques	30
1.1.8.3.2	Effets de l'uranium sur le comportement à l'âge adulte	31
1.1.8.3.2.1	Locomotion	31
1.1.8.3.2.2	Cycle veille/sommeil	32
1.1.8.3.2.3	Fonctions cognitives	32
1.1.8.3.2.4	Troubles émotionnels	32
1.1.8.4	Effets de l'uranium sur le comportement au cours du développement	33
1.1.9	Mécanismes cellulaire et moléculaire des effets centraux de l'uranium	33
1.1.9.1	Stress oxydant	34
1.1.9.2	Neurotransmetteurs	35
1.1.9.2.1	Acétylcholine	35
1.1.9.2.2	Monoamines	36
1.1.9.3	Propriétés neurophysiologiques	37
	Revue : the neurotoxicology of uranium	39
1.2	Le cerveau : un système dynamique au centre des fonctions comportementales	55
1.2.1	Le cerveau en développement	56
1.2.1.1	Morphogenèse du système nerveux central	56
1.2.1.2	La neurogenèse télencéphalique	57
1.2.1.2.1	Les cellules souches neurales	58
1.2.1.2.2	Développement du cortex	59
1.2.1.2.2.1	Structure du néocortex	60
1.2.1.2.2.2	Les différents types de neurones	61
1.2.1.2.2.3	Étapes de formation du néocortex	61
1.2.1.2.2.4	Processus de prolifération cellulaire	61
1.2.1.2.2.5	Migration radiaire et tangentielle	65
1.2.1.2.2.6	Voies de signalisation neuronales	67
1.2.1.2.2.7	Processus de mort cellulaire	68
1.2.1.2.3	Développement de l'hippocampe	69

1.2.1.2.3.1	Structure de l'hippocampe	69
1.2.1.2.3.2	Types de neurones	71
1.2.1.2.3.3	Étapes de formation de l'hippocampe	71
1.2.1.2.3.4	Neurogenèse de l'hippocampe	72
1.2.1.3	Le complexe neuro-vasculaire	77
1.2.2	Persistence de la neurogenèse à l'âge adulte	81
1.2.2.1	Origine des cellules souches neurales à l'âge adulte	81
1.2.2.2	Neurogenèse dans la zone sous-granulaire du gyrus denté	83
1.2.2.2.1	Prolifération cellulaire	83
1.2.2.2.2	Différenciation et migration neuronale	83
1.2.2.2.3	Voies de signalisation neuronales	84
1.2.2.2.4	Intégration synaptique	85
1.2.2.2.5	Mort cellulaire	86
1.2.3	Modulation physio-pathologiques de la neurogenèse	86
1.2.3.1	Conséquences à l'âge adulte d'une perturbation de la neurogenèse au cours du développement	86
1.2.3.2	Corrélation entre la neurogenèse adulte hippocampique et les fonctions cognitives et émotionnelles	87
1.2.3.2.1	Facteurs stimulants la neurogenèse	88
1.2.3.2.2	Facteurs inhibant la neurogenèse	89
1.3	Uranium et neurogenèse : une neurotoxicité comparable aux métaux lourds	91
1.4	Problématique	93
2	Matériels et méthodes	96
2.1	Protocole de contamination des animaux	96
2.1.1	Uranium	96
2.1.2	Protocole de contamination	96
2.2	Réaction de polymérisation en chaine en temps réel (RT-PCR)	99
2.3	Expérimentation à l'âge adulte	101
2.3.1	Réalisation des coupes	101
2.3.2	Marquages immunohistochimiques	101
2.3.2.1	Double-marquage Bromodéoxyuridine (BrdU) - Neuronal Nuclei (NeuN)	101
2.3.2.2	Double-marquage Doublecortine (DCX) - Neuronal Nuclei (NeuN)	102
2.4	Analyses statistiques	102
3	Résultats	103
3.1	Suivi des animaux et des concentrations d'uranium	103

3.1.1	Suivi des consommations hydrique et alimentaire des animaux	103
3.1.2	Suivi du poids des animaux	104
3.1.3	Concentration d'uranium dans les tissus	104
3.2	Perturbation de la neurogenèse au cours du développement chez des animaux exposés à l'uranium dès le stade <i>in utero</i>	106
3.2.1	Modifications dans les processus de prolifération et de mort cellulaire aux stades prénatals et postnatals	106
Article : Cell proliferation and cell death are disturbed during prenatal and postnatal brain development after uranium exposure		109
3.2.2	Modifications dans le processus de différenciation neuronale aux stades prénatals et postnatals	123
3.2.2.1	Expression des gènes Wnt3a, Gap43, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 par RT-PCR	123
3.2.2.1.1	Aux stades prénatals	123
3.2.2.1.2	Aux stades postnatals	124
3.2.2.2	Étude du processus de différenciation neuronale au niveau du neuroépithélium hippocampique après exposition à l'uranium à 40 mg/L	124
3.2.2.2.1	Expression génique <i>in situ</i> aux stades prénatals	125
3.2.2.2.2	Étude de la nestine et de la doublecortine aux stades prénatals	126
3.2.2.2.3	Expression génique <i>in situ</i> au stade P5	127
3.2.2.2.4	Étude de la doublecortine aux stades postnatals	128
3.2.2.2.5	Étude du comportement des rats P21 exposés à l'uranium à 40 mg/L	132
3.2.2.3	Étude du processus de différenciation neuronale au niveau du neuroépithélium hippocampique après exposition à l'uranium à 120 mg/L et tests comportementaux	132
Article : Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring		135
3.2.2.4	Étude du processus de différenciation neuronale au niveau du neuroépithélium cortical après exposition à l'uranium à 40 et à 120 mg/L	161
3.2.2.4.1	Expression génique <i>in situ</i> au stade E18	161
3.2.2.4.2	Étude de la nestine et de la doublecortine aux stades prénatals	161
3.3	Modification de la neurogenèse et du comportement des rats adultes exposés à l'uranium dès le stade <i>in utero</i>	162
3.3.1	Effets de l'uranium sur le processus de neurogenèse	163
3.3.1.1	Effets sur la morphologie structurale de l'hippocampe	163
3.3.1.2	Effets sur le processus de prolifération cellulaire dans la zone sous-granulaire	164
3.3.1.3	Effets sur le processus de différenciation neuronale	165
3.3.2	Études comportementales des rats adultes après exposition dès le stade <i>in utero</i>	166

3.4	Récapitulatif des résultats	169
4	Discussion	170
4.1	Où est retrouvé l'uranium dans les tissus après exposition <i>in utero</i> ?	171
4.1.1	Présence d'uranium dans les embryons/fœtus et dans les reins	171
4.1.2	Présence d'uranium dans le cerveau	172
4.2	L'exposition à l'uranium <i>in utero</i> a-t-elle une incidence sur l'état général des animaux?174	
4.3	L'exposition à l'uranium dès le stade <i>in utero</i> entraîne-t-elle des modifications dans les processus de la neurogenèse?	175
4.3.1	Neurogenèse au cours de la période prénatale	176
4.3.2	Neurogenèse au cours de la période postnatale	179
4.3.3	Neurogenèse adulte	181
4.4	Quelles peuvent être les conséquences neurophysiologiques suite aux modifications observées dans les processus de neurogenèse?	183
4.4.1	Troubles de la neurogenèse et morphologie du cerveau	183
4.4.2	Troubles de la neurogenèse et perturbation de la mémoire spatiale et de la dépression	185
5	Conclusion	190
	Bibliographie	191
	Valorisations	214

Liste des abréviations

ACh : acétylcholine
AChE : acétylcholine estérase
ADNc : acide désoxyribo-nucléique complémentaire
AFFSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ALAT : alanine amino transférase
ASAT : aspartate amino transférase
ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry
β2MG : béta-2-microglobuline
BDNF : brain derived neurotrophic factor
BHE : barrière hémato-encéphalique
bHLH : basix helix-loop-helix
BrdU : bromodéoxyuridine
CA : corne d'Ammon
CAT : catalase
CIRC : centre international de recherche sur le cancer
DA : dopamine
DCX : doublecortine
DL50 : dose létale 50
DMT1 : divalent metal transporter 1
DOPAC : 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
E : embryonnaire
EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
EGC : éminence ganglionnaire caudale
EGL : éminence ganglionnaire latérale
EGM : éminence ganglionnaire médiane
FGF : fibroblast growth factor
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate
GABA : acide gamma amino butyrique
GCL : granular cell layer
GD : gyrus denté
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GPx : glutathion peroxidase
GR : glutathion réductase
H : hile
HES : enhancer of split
HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
ICP-MS : induced coupled plasma-masse spectrometry
ICRP : The International Commission on Radiological Protection

IRSN : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire
JAG : jagged
nICP : neural intermediate cell progenitor
NeuN : neuronal nuclei
NHEJ : non-homologous end-joining
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
NO : nitric oxide
NOAEL : no observed adverse effect level
OCT : optimal cutting temperature
OMS : organisation mondiale de la santé
P/PND : postnatal
PDGF-B : platelet derived growth factor B
PBS : phosphate buffured saline
PC : plaque corticale
PCNA : proliferating cell nuclear antigen
PFA : paraformaldéhyse
PLT : potentialisation à long terme
PPC : pré-plaque corticale
PSA-NCAM : polysialated form of neural cell adhesion molecule
RT-PCR : polymérase chain reaction
Shh : sonic hedgehog
SNC : système nerveux central
SOD : superoxide dismutase
U : uranium
UA : uranium appauvri
UE : uranium enrichi
UN : uranium naturel
VEGF : vascular endothelial growth factor
WHO : world health organisation
ZG : zone granulaire
ZSG : zone sous-granulaire
ZI : zone intermédiaire
ZSV : zone sous ventriculaire
ZV : zone ventriculaire

Liste des figures

1	Oxyde d'uranium (Yellowcake)	16
2	Processus d'enrichissement de l'uranium	16
3	Voies d'exposition et biocinétique de l'uranium dans l'organisme	19
4	Étapes de formation du tube neural	56
5	Formation des cinq vésicules constituant le système nerveux central	57
6	Formation du télencéphale	58
7	Les différentes couches constituant le néocortex	60
8	Stades de formation des différentes structures du cortex	62
9	Processus de neurogenèse au niveau du cortex au cours du développement	63
10	Polarité des cellules et migration intercinétique nucléaire	64
11	Mode de migration des cellules pyramidales dans le cortex et l'hippocampe	66
12	Structures de l'hippocampe adulte	70
13	Stade de formation des différentes structures de l'hippocampe	72
14	Formation de l'hippocampe aux stades prénatal et postnatal	73
15	Développement du gyrus denté aux stades postnatals	74
16	Différenciation des cellules granulaires dans le GD en développement	77
17	Expression temporelle et spatiale des principaux gènes impliqués dans le processus de différenciation neuronale au niveau du gyrus denté de l'hippocampe aux stades postnatals	78
18	Composants du complexe neurovasculaire	79
19	Différents mécanismes de passage du sang vers le cerveau	80
20	Origines gliales des cellules souches à l'âge adulte	82
21	Étapes de la neurogenèse dans la zone sous-granulaire du gyrus denté à l'âge adulte	84
22	Protocole de contamination des animaux	97
23	Expression des gènes Wnt3a, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 à E13 et E18	124
24	Expression des gènes Gap43, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 à P0, P5 et P21	125
25	Hybridation <i>in situ</i> du gène Wnt3a au stade E13	126
26	Hybridation <i>in situ</i> des gènes Notch1, Mash1 et NeuroD au stade E18	127
27	Marquage immunohistochimique de la nestine aux stades E13 et E18	128
28	Marquage immunohistochimique de la doublecortine aux stades E13 et E18	129
29	Hybridation <i>in situ</i> des gènes Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 au stade P5	130
30	Marquage immunohistochimique de la doublecortine aux stades P0, P5 et P21	131

31	Quantification de la nestine ou de la doublecortine dans le neuroépithélium cortical latéral et médian à E13 et à E18	162
32	Coloration au crésyl violet de coupes transversales d'hippocampe de rats adultes . . .	163
33	Coloration au crésyl violet d'une coupe transversale d'hippocampe d'un animal exposé UA 120	164
34	Étude de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté des rats adultes	165
35	Description des zones du gyrus denté étudiées au microscope confocal	165
36	Étude du devenir des cellules marquées au BrdU au niveau de la pointe du gyrus denté des rats adultes	166
37	Étude de la différenciation neuronale au niveau du gyrus denté des rats adultes	167
38	Étude du comportement des rats adultes	168
39	Résumé des résultats sur le processus de neurogenèse et sur le comportement des rats	169

Liste des tableaux

1	Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium	15
2	Caractéristiques des différents types d'uranium	17
3	Répartition des groupes d'animaux pour les expérimentations	99
4	Séquences des primers utilisés pour la RT-PCR	100
5	Consommations hydrique et alimentaire	103
6	Poids des animaux	104
7	Tableau récapitulatif des concentrations d'uranium dans les tissus	105
8	Intensité d'expression des gènes impliqués dans la différenciation neuronale	132

Avant-propos

Depuis la découverte de ses propriétés énergétiques dans les années 1930, l'utilisation de l'uranium a suscité de nombreux intérêts. En effet, l'uranium a des applications dans l'industrie nucléaire civile comme combustible et a des utilisations militaires dans le blindage d'obus ou de chars. Ces nombreuses applications augmentent la dissémination de l'uranium dans l'environnement et contribuent ainsi à l'exposition des populations. Différents types de populations sont susceptibles d'être contaminés à l'uranium, les populations civiles vivants à proximité des centrales ou dans les zones de conflit, les travailleurs du nucléaire et les militaires, les vétérans de la guerre du Golfe soumis aux tirs contenant de l'uranium appauvri, ce qui soulève des inquiétudes concernant les risques pour la santé humaine.

L'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) a mis en place le programme ENVIRHOM (de l'ENVIRONnement à l'HOMme) en 2001 afin d'évaluer les risques liés à l'exposition chronique à de faibles concentrations de radionucléides sur les grands systèmes physiologiques (système nerveux, système immunitaire, système cardiovasculaire, rénal ou système reproducteur).

Cette thèse s'intègre dans ce programme et s'intéresse plus particulièrement aux effets d'une contamination interne à l'uranium sur les fonctions cérébrales. Expérimentalement, il est bien démontré à ce jour qu'une exposition à l'uranium induit des troubles des fonctions cérébrales après contamination interne, avec notamment des troubles de la locomotion, de la mémoire spatiale ou de l'anxiété chez le rat adulte. Cependant, les effets de l'uranium suite à une contamination au cours du développement ne sont pas encore suffisamment connus. Or, sur les territoires contaminés, l'ensemble de la population peut être exposé à l'uranium, incluant les femmes enceintes et les enfants. Plusieurs mécanismes d'action potentiels pouvant être à l'origine de la neurotoxicité de l'uranium ont été explorés, notamment les neurotransmetteurs (acétylcholine, dopamine, sérotonine) ou la balance pro/anti oxydante. Cependant, nous sommes encore loin de connaître comment l'uranium agit sur les fonctions cérébrales.

Dans ma thèse, je me suis intéressée à la neurogenèse. Pendant le développement, ce processus permet la formation du système nerveux central et la mise en place des réseaux neuronaux. De plus, il est maintenant clairement établi qu'à l'âge adulte, le processus de neurogenèse est encore actif dans certaines régions du cerveau et est à la base des capacités de plasticité synaptique. C'est pourquoi, l'objectif de mon travail était d'étudier les conséquences d'une contamination chronique à l'uranium au cours du développement jusqu'à l'âge adulte sur les processus de la neurogenèse.

1 Introduction

1.1 L'uranium

1.1.1 Découverte historique

L'uranium (U) a été découvert en 1789 par le chimiste Martin Klaproth. Ce métal lourd est naturellement présent au niveau de la croûte terrestre, de l'air et de l'eau. Ses propriétés radioactives naturelles ont été mises en évidence par Henri Becquerel en 1896 lorsqu'il constata que des plaques photographiques placées à côté de sels d'uranium avaient été impressionnées sans avoir été exposées à la lumière. Cette découverte marqua le début de l'histoire de la radioactivité. L'uranium possède donc à la fois une toxicité chimique du fait de ses propriétés de métal lourd et une toxicité radiologique due à sa radioactivité.

1.1.2 Caractéristiques

1.1.2.1 Propriétés physico-chimiques

L'uranium est le dernier élément naturel du tableau périodique de Mendeleïev. Il appartient à la famille des actinides et possède le numéro atomique $Z=92$. À l'état pur, l'uranium est un métal gris blanc, malléable et ductile. C'est l'élément le plus lourd présent naturellement, sa densité est de 19 g/cm^3 (1,7 fois plus que le plomb).

L'uranium existe sous différentes formes physico-chimiques, il possède six électrons périphériques facilement extractibles et peut se présenter aux valences III, IV, V et VI. L'uranium peut donc s'associer avec différents éléments, tels que l'oxygène, le soufre ou l'azote.

En milieu aqueux et dans les fluides biologiques, l'uranium est sous la forme d'ion uranyle UO_2^{2+} (état d'oxydation VI). Les ions uranium sont considérés comme des acides durs et vont donc réagir préférentiellement avec les bases dures comme l'oxygène. Ils forment différents complexes par l'intermédiaire de l'ion uranyle UO_2^{2+} principalement avec les phosphates, carbonates et carboxylates. L'ion uranyle est l'espèce dominante dans les eaux de surface en milieu oxydant (jusqu'à pH 6). Aux pH supérieurs, apparaissent des formes hydroxylées puis pour des pH supérieurs à 8, des formes carbonylées (Sutton et Burastero 2004). L'uranium dont nous allons parler dans la suite de ce manuscrit est donc de l'uranyle U_{VI} , que nous nommerons uranium.

1.1.2.2 Propriétés radiologiques

À l'état naturel, l'uranium est composé de 23 isotopes, tous radioactifs, dont trois principaux : ^{238}U (99,28 %), ^{235}U (0,71 %) et ^{234}U (0,01 %) (tableau 1). L' ^{234}U est produit par la désintégration alpha de l' ^{238}U et ne représente qu'une infime partie de la masse totale d'uranium. Cependant, il est plus radioactif et contribue à la moitié de la radioactivité totale de l'uranium naturel. Ces isotopes se désintègrent en émettant des rayonnements alpha ayant un faible pouvoir pénétrant. Néanmoins, ces rayonnements sont fortement ionisants, car ils cèdent toute leur énergie sur une faible distance. Les chaînes de désintégration de l' ^{235}U et de l' ^{238}U conduisent à la formation du thorium, de radon et de plomb. Ils possèdent une période très longue.

Isotope	Abondance naturelle	Période de décroissance (années)	Activité massique (Bq/g)	Caractéristique
^{238}U	99,2836	4,5 milliards	$12,4 \times 10^3$	
^{235}U	0,7110	0,7 milliards	$5,8 \times 10^2$	Seul isotope fissile
^{234}U	0,0054	245 000	$12,5 \times 10^3$	Isotope naturel le plus radioactif
^{232}U	-	70	$8,2 \times 10^{11}$	
^{236}U	-	23,4 millions	$2,39 \times 10^6$	

TABLEAU 1 – Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium

1.1.3 Utilisations de l'uranium

Historiquement, le minerai d'uranium était utilisé comme un pigment dans la céramique, la verrerie ou la faïence. Il produit une coloration jaune à faible concentration, puis crème, orange, brun, vert ou noir, quand la concentration augmente.

1.1.3.1 Enrichissement de l'uranium

Dans les années 1930, l'équipe d'Enrico Fermi a mis en évidence qu'un bombardement de l'uranium par des neutrons est à l'origine d'une émission d'énergie considérable. L' ^{235}U est le seul isotope fissile, c'est-à-dire que par capture de neutrons, il peut se scinder en deux noyaux fils avec une émission d'énergie très importante. C'est le phénomène de fission nucléaire.

Cette découverte est à l'origine du processus d'enrichissement de l'uranium qui consiste à augmenter la concentration en ^{235}U . L'uranium enrichi a des applications civiles en tant que combustible dans le cycle électronucléaire lorsqu'il est enrichi en ^{235}U à 3 %. L'uranium enrichi a aussi des ap-

pliques militaires, quand il est enrichi en ^{235}U à plus de 90 %, avec notamment la création des premières bombes atomiques par les États-Unis en 1941.

Actuellement, l'extraction de l'uranium est uniquement liée à son utilisation dans le cycle électronucléaire. Après son extraction, le minerai d'uranium « Pechblende » est concentré sous forme d'oxyde d'uranium (U_3O_8) appelé « yellowcake » (figure 1). Il est ensuite purifié en oxyde d'uranium UO_2 et enrichi en ^{235}U pour être utilisé comme combustible nucléaire (figure 2).



FIGURE 1 – Oxyde d'uranium (Yellowcake) (source : World Nuclear Association)

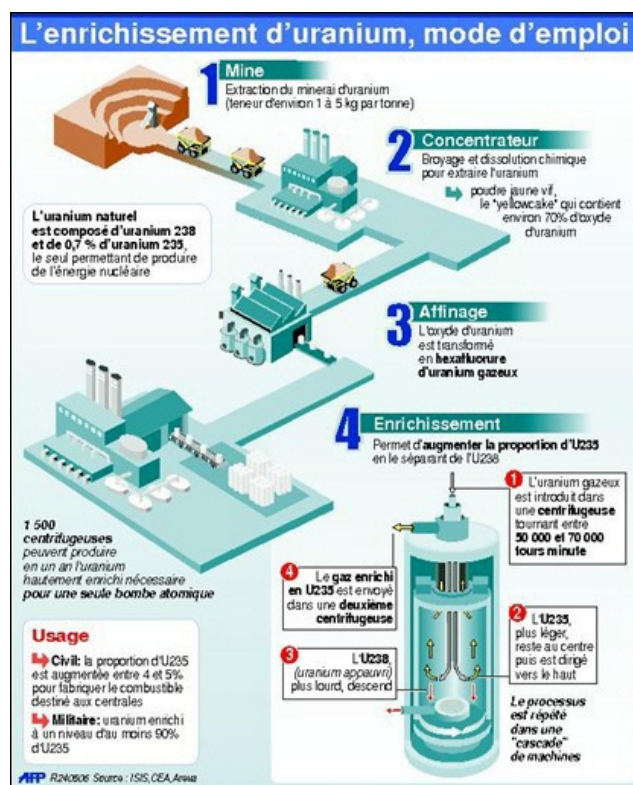


FIGURE 2 – Processus d'enrichissement de l'uranium (source : CEA)

L'uranium extrait des mines est d'abord dissous dans l'acide et purifié. Après précipitation et calcination, la poudre de trioxyde d'uranium (UO_3) obtenue est transformée en UF_4 par réaction d'hydrofluoruration. L' UF_4 est ensuite converti en hexafluorure d'uranium (UF_6) par une réaction de fluoruration. L' UF_6 gazeux est solidifié et peut être enrichi par ultra-centrifugation en différentes proportions d' ^{235}U (UF_4 : tétrafluorure d'uranium, UO_3 : trioxyde d'uranium, UF_6 : hexafluorure d'uranium).

1.1.3.2 L'uranium appauvri

L'uranium appauvri est un sous-produit issu du processus d'enrichissement. Il contient environ 0,3 % d'²³⁵U et possède la même toxicité chimique que l'uranium naturel, mais il est 40 % moins radioactif (tableau 2). Du fait de sa dureté et de sa forte densité, l'uranium appauvri a de nombreuses applications civiles comme le lestage d'ailes d'avion ou comme bouclier de protection contre les rayonnements ionisants dans le matériel médical utilisé pour les radiothérapies. L'uranium appauvri a aussi des applications militaires, telles que le blindage des chars ou des têtes d'obus (WHO 2001).

Type	Masse d' ²³⁵ U (%)	Activité (kBq/g)
Uranium naturel	0,7	25
Uranium enrichi	3	42
Uranium appauvri	0,3	14

TABLEAU 2 – Caractéristiques des différents types d'uranium

1.1.4 Sources d'exposition

1.1.4.1 Expositions naturelles

L'uranium est un métal naturellement présent dans la croûte terrestre avec une concentration moyenne de 2 mg/kg qui varie en fonction de la constitution des roches (granitique ou sédimentaire) (ATSDR 2013). Cette présence naturelle de l'uranium constitue un risque pour la population générale, principalement suite à l'ingestion d'eau de boisson ou d'aliments contaminés. Les populations dont le risque d'exposition est le plus important sont celles qui vivent sur des territoires dans lesquels la teneur en uranium naturel est particulièrement importante, notamment en Finlande où la plus forte concentration (20 mg/L) a été mesurée dans les eaux souterraines (de 100 à 1000 fois plus élevée que la moyenne mondiale) (Prat *et al.* 2009) et dans certaines régions des États-Unis d'Amérique ou du Mexique (Hakonson-Hayes *et al.* 2002). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que la concentration en uranium dans l'eau est comprise entre 0,05 et 4 µg/L (WHO 2012). En France, la concentration en uranium mesurée entre 2008 et 2009 dans les eaux de boisson est comprise entre 0,14 et 114 µg/L avec une valeur moyenne de 2,22 µg/L (AFFSA 2010, IRSN 2011). Selon l'OMS, l'homme ingère quotidiennement 1 à 4 µg d'uranium par l'alimentation et 1,5 µg dans les eaux de boisson (WHO 2012). Suite aux différentes études réalisées sur l'uranium, l'OMS a fixé une valeur seuil de l'uranium dans l'eau à 30 µg/L (WHO 2011), cette valeur avait précédemment été fixée à 15 µg/L en 2006 (WHO 2006).

1.1.4.2 Expositions dues aux activités humaines

À l'exposition naturelle s'ajoute l'exposition liée aux activités humaines. Les nombreuses utilisations de l'uranium participent à l'augmentation de sa dissémination dans l'environnement et contribue à l'exposition des populations. De part son utilisation dans le cycle électronucléaire, les populations civiles vivant autour des centrales, ainsi qu'aux alentours des anciens sites miniers, peuvent être exposées à l'uranium. De plus, les mineurs et les travailleurs des usines d'enrichissement, de production et de retraitement de l'uranium présentent un risque d'exposition suite à l'inhalation possible de poussières contenant de l'uranium ou suite à des blessures par transfert cutané (Ubios *et al.* 1997, Paquet *et al.* 2009). D'autre part, lors de conflits internationaux pendant lesquels l'uranium appauvri a été utilisé comme composant d'armes militaires, l'environnement a pu être contaminé, augmentant ainsi les sources d'exposition pour les militaires et les populations locales (Miller *et al.* 2004, McDiarmid *et al.* 2009). De plus, l'utilisation massive des engrais phosphatés contenant de l'uranium participe à sa dissémination dans l'environnement (Boukhenfouf et Boucenna 2012). Ainsi, les populations civiles dans les zones de conflits sont exposées à l'uranium principalement *via* l'ingestion d'eau de boisson ou d'aliments contaminés. Les militaires atteints par des projectiles contenant de l'uranium appauvri lors des tirs ou des bombardements pendant les conflits sont exposés à l'uranium par pénétration transcutanée.

1.1.5 Biocinétique de l'uranium

Les principales voies d'exposition de l'Homme à l'uranium sont la pénétration transcutanée *via* la peau lésée, l'inhalation et l'ingestion (figure 3). La biodistribution de l'uranium dans l'organisme dépend de sa spéciation chimique.

Après pénétration transcutanée liée à une blessure, l'uranium est absorbé et peut rejoindre le compartiment sanguin. Le taux de passage de l'uranium dépend de l'intégrité de la peau (peau lésée ou non), ainsi que de la solubilité de l'uranium (Petitot *et al.* 2007).

Après inhalation de poussières contenant de l'uranium, la distribution dans l'appareil respiratoire dépend de la taille des particules absorbées. Sa distribution dans l'organisme dépend de sa solubilité. La quasi-totalité des composés solubles passent dans la circulation systémique après quelques heures.

Par contre, les composés très insolubles restent au niveau des poumons pendant quelques jours à quelques années (ICRP 1995). L'uranium est pris en charge au niveau des macrophages alvéolaires et par les cellules épithéliales respiratoires.

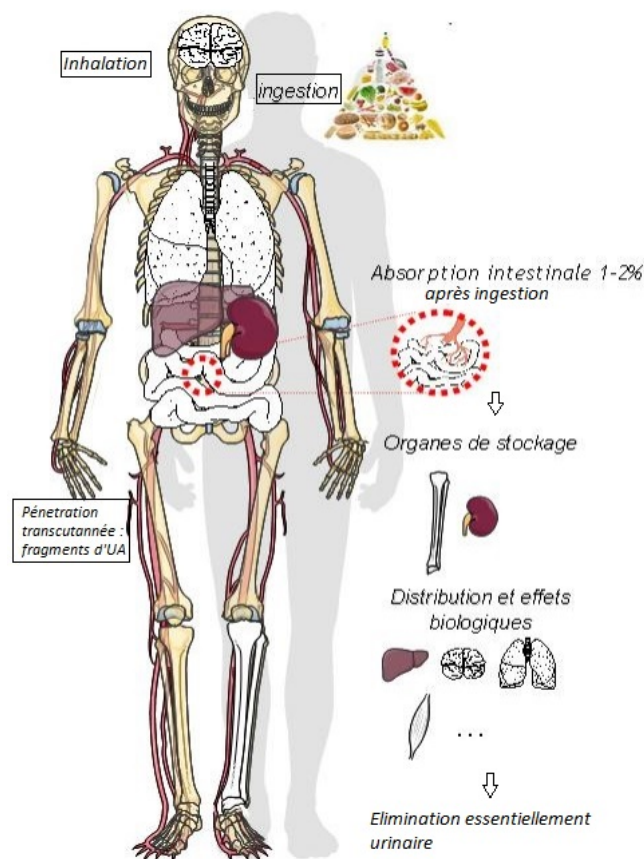


FIGURE 3 – Voies d'exposition et biocinétique de l'uranium dans l'organisme

Les principales voies d'exposition de l'uranium sont l'ingestion *via* l'eau de boisson ou les aliments contaminés, l'inhalation de particules d'uranium ou la pénétration transcutanée d'uranium.

Après ingestion d'uranium, une faible quantité est absorbée au niveau intestinal (Dublineau *et al.* 2005) avec un taux d'absorption de 1 à 1,5 % chez les hommes (Wrenn *et al.* 1985) et de 0,4 % chez le rat (Frelon *et al.* 2005). L'intestin grêle est le principal organe de transfert de l'uranium depuis le bol alimentaire vers le compartiment sanguin (Dublineau *et al.* 2005). Dans la circulation générale, l'uranium est sous forme d'ions uranyles et se complexe à des protéines plasmatiques comme la transferrine ou l'albumine (Cooper *et al.* 1982, Michon *et al.* 2010). Quelques heures après son passage dans le sang, l'uranium se retrouve principalement au niveau du cortex rénal et des os, qui sont les deux principaux organes de stockage de l'uranium. Une infime quantité est retrouvée dans les tissus mous tels que les poumons, le cerveau et le foie (Pellmar *et al.* 1999, Craft *et al.* 2004, Paquet *et al.* 2006). Dans le rein, l'uranium est filtré au niveau glomérulaire et est réabsorbé par le tube contourné proximal (Craft *et al.* 2004). L'os constitue un organe de stockage à long terme de l'uranium, les ions uranyles se substituent aux ions calciques lors du remodelage osseux (Leggett 1994). Environ 98 % de l'uranium est éliminé directement *via* les fèces sans être absorbé dans le sang. L'excrétion de l'uranium sanguin est essentiellement urinaire. Environ 85 % de l'uranium est

éliminé dans les 3 mois après ingestion (WHO 2003). Cependant, l'uranium stocké dans les os a une élimination beaucoup plus lente avec une demi-vie de rétention de 300 à 5000 jours (Wreen *et al.* 1985, Craft *et al.* 2004).

1.1.6 Toxicité de l'uranium

L'uranium possède une toxicité chimique due à ses propriétés de métal lourd et une toxicité radiologique due à sa nature de radioélément. L'uranium naturel et appauvri présentent majoritairement une toxicité chimique. L'uranium enrichi possède, en plus d'une toxicité chimique, une plus forte toxicité radiologique selon le degré d'enrichissement en ^{235}U (Craft *et al.* 2004).

Concernant les études expérimentales, en fonction de la durée d'exposition, trois types de toxicité sont observés :

- une toxicité aiguë, qui correspond à une exposition à de fortes concentrations d'uranium pendant un temps court (de quelques heures à quelques jours) ;
- des toxicités sub-chronique (90 jours) et chronique, qui correspondent à une exposition à l'uranium pendant un temps plus long.

La dose létale 50 (DL50) chez le rat a été estimée à 204 mg/kg après exposition orale unique par gavage (Domingo *et al.* 1987). L'intoxication aiguë chez le rat se traduit par une altération de l'état général avec perte de poids, hypothermie, tremblements, hémorragies oculaires et myosis (Domingo *et al.* 1987), ainsi que par des signes d'atteinte rénale (néphrite) et cérébrale.

Les effets mutagènes et cancérogènes de l'uranium sont encore mal connus. L'uranium appartient à la catégorie 3 du classement CIRC (Centre international de recherche sur le cancer), c'est-à-dire en tant qu'agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme.

1.1.6.1 Toxicité de l'uranium sur les principaux organes cibles

1.1.6.1.1 Les reins

Des études épidémiologiques sur des populations consommant de l'eau de boisson ont montré qu'une ingestion quotidienne d'uranium à des doses supérieures à 0,03 mg/kg/jour entraînait une atteinte tubulaire par modification de l'excrétion de calcium, une augmentation de l'excrétion de β 2-microglobuline, et par la présence d'une glycosurie (Zamora *et al.* 1998, Kurttio *et al.* 2002). Cependant, ces modifications de la fonction rénale ne sont pas confirmées par d'autres études (Kurttio *et al.* 2006, Selden *et al.* 2009). De plus, les mineurs d'uranium ont fait l'objet d'études de suivi dans lesquelles il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'exposition à l'uranium et l'apparition de maladies rénales (Boice *et al.* 2003, Boice *et al.* 2008). Enfin, des études réalisées sur les vétérans de la guerre du Golfe et du conflit dans les Balkans ont montré la présence d'uranium dans

les urines jusqu'à 18 ans après l'incorporation de fragments d'obus dans le corps (McDiarmid *et al.* 2000, McDiarmid *et al.* 2006, McDiarmid *et al.* 2011). Cependant, il n'a pas été mis en évidence de dysfonctionnements tubulaires rénaux chez ces vétérans (McDiarmid *et al.* 2006, McDiarmid *et al.* 2009, McDiarmid *et al.* 2013). Enfin, une augmentation du nombre de cancers des reins a été mise en évidence sur des mineurs d'uranium (Vacquier *et al.* 2008). En revanche, des études épidémiologiques réalisées sur des populations consommant de l'eau naturellement riche en uranium n'ont établi aucun lien entre cette consommation et l'apparition de cancers pour différents organes dont la vessie et le rein (Kurtio *et al.* 2006).

Le rein est particulièrement exposé à l'uranium par son rôle de filtre de l'organisme. Après filtration glomérulaire, l'uranium passe dans le tube contourné proximal où il est absorbé au niveau des cellules épithéliales. À ce niveau, l'uranium précipite sous forme d'aiguilles de phosphate d'uranyle (Leggett 1989). Le rein est un organe de stockage à court terme de l'uranium et l'effet néphrotoxique est principalement dû à la chimiotoxicité de l'uranium (Souidi *et al.* 2009).

À forte dose, 204 mg/kg par ingestion, l'uranium entraîne une néphrite tubulaire aiguë responsable de la mort de l'animal (Domingo *et al.* 1987). Suite à une exposition aiguë à l'uranium, les lésions rénales sont principalement situées au niveau des tubules contournés proximaux (Haley *et al.* 1982, Diamond *et al.* 1989). À forte dose, l'uranium entraîne des néphropathies sévères affectant principalement les tubules proximaux et les structures glomérulaires (Diamond *et al.* 1989). L'uranium entraîne aussi des désordres fonctionnels rénaux, tels que des polyuries, des protéinuries et l'élévation de la créatinine et de l'urée (Domingo *et al.* 1987, Diamond *et al.* 1989). Cependant, l'atteinte rénale semble être réversible après une exposition de courte durée (Haley *et al.* 1982, Diamond *et al.* 1989). Une augmentation de la créatinine ainsi que de l'urée plasmatique a été observée après injection en sous-cutanée de 11,5 mg/kg d'uranium appauvri (Gueguen *et al.* 2006).

Après contamination chronique *via* l'eau de boisson, l'atteinte rénale est essentiellement tubulaire chez le rat (Gilman *et al.* 1998, Ortega *et al.* 1989). Des altérations glomérulaires ont aussi été observées chez le rat (Gilman *et al.* 1998). Les paramètres biochimiques sont également perturbés avec une augmentation du glucose urinaire après contamination pendant 1 et 3 mois (Ortega *et al.* 1989, Gilman *et al.* 1998). De plus, la créatinine plasmatique est augmentée après 4 mois de contamination à 13 et 26 mg/kg/jour (Taulan *et al.* 2004). La créatinine, l'urée plasmatique, la β 2-microglobuline et l'albumine urinaire sont augmentées après implant d'uranium dans le muscle (0,1 g d'uranium par implant) (Zhu *et al.* 2009). Par ailleurs, une étude récente après contamination chronique à l'uranium (de 0,05 à 30 mg/kg/jour) pendant 3 et 9 mois par ingestion d'eau de boisson n'a pas mis en évidence de néphrotoxicité (Poisson *et al.* 2014).

1.1.6.1.2 Les os

Peu d'études épidémiologiques ont été réalisées concernant les effets de l'uranium sur les os. Une étude réalisée sur une population exposée quotidiennement à l'uranium par l'eau de boisson à de faibles doses (27 µg/L) pendant 13 ans a montré une augmentation de certains marqueurs osseux (ostéocalcine, télopeptide C-terminal du collagène de type 1) (Kurttio *et al.* 2005). De plus, le suivi des vétérans de la guerre du Golfe a mis évidence l'apparition de légères modifications au niveau de la formation osseuse sans modification de la vitamine D et de la parathormone 16 ans après l'exposition (McDiarmid *et al.* 2009).

L'os est le lieu de stockage à long terme de l'uranium (Pellmar *et al.* 1999, Zhu *et al.* 2009). La fixation de l'uranium à la surface de l'os se fait par échange d'ions uranyles avec les ions calcium présents dans les cristaux d'hydroxyapatite (Leggett 1994, Zhu *et al.* 2009). L'uranium s'accumule préférentiellement dans les zones de croissance et les zones vascularisées (Priest *et al.* 1982).

L'exposition à l'uranium par injection intramusculaire à la concentration de 0,2 à 2 mg/kg ou par intraveineuse à 0,8 mg/kg entraîne une inhibition de la formation osseuse et une augmentation de la résorption osseuse (Fukuda *et al.* 2006). Une contamination subchronique pendant 30 jours par implantation sous-cutanée d'uranium provoque une inhibition de la formation osseuse comme décrite après contamination en exposition aiguë (Diaz Sylvester *et al.* 2002).

Une étude sur un modèle, dont la contamination commence dès la naissance à 2 mg/kg/jour, a montré une diminution du diamètre de l'os cortical (Wade Gueye *et al.* 2012). De plus, l'expression des gènes impliqués dans la différenciation en ostéoblaste, dans le remodelage osseux, dans la minéralisation de l'os et dans le transport du calcium ou de la vitamine D est diminuée après contamination à l'uranium appauvri. Dans les mêmes conditions expérimentales lorsque la contamination débute à l'âge adulte, aucune perturbation n'est observée. Cette étude suggère donc une sensibilité à l'uranium plus forte chez les animaux en croissance. Des données suggèrent également que l'exposition chronique à l'uranium pourrait entraîner des cancers osseux chez les rongeurs (Miller *et al.* 2002).

Même si l'accumulation est moins importante que dans les reins et les os, d'autres organes sont des cibles de la toxicité de l'uranium.

1.1.6.2 Toxicité de l'uranium sur les autres organes

1.1.6.2.1 Les poumons

Lors d'une contamination par inhalation, les poumons constituent la première cible biologique. Des études épidémiologiques ont montré une augmentation des fibroses pulmonaires chez des mineurs (Archer *et al.* 1998) sans toutefois constater une augmentation de la mortalité par maladies respiratoires chez ces travailleurs par rapport aux populations non exposées (Tirmarche *et al.* 2004).

Chez le rongeur, le développement d'une réaction inflammatoire est le principal effet observé après contamination par instillation (Pasanen *et al.* 1995) ou par inhalation (Monleau *et al.* 2006). Des expositions chroniques à l'hexafluorure d'uranium (13 mg/m³) pendant 6 heures par jour durant 30 jours entraînent des œdèmes pulmonaires et une inflammation des bronches (ATSDR 2013).

Une corrélation entre l'exposition par inhalation d'uranium et l'augmentation du nombre de cancers des poumons a également été mise en évidence sur des mineurs d'uranium (Vacquier *et al.* 2008). Cependant, des études récentes ont montré que le cancer des poumons serait dû à l'exposition au radon (Boice *et al.* 2007, Vacquier *et al.* 2009).

1.1.6.2.2 Le cœur

Peu de données sont disponibles sur les éventuels effets de l'uranium sur le système cardiovasculaire. Une étude réalisée sur une cohorte de travailleurs de l'industrie nucléaire a montré que l'exposition à l'uranium entraîne des ischémies vasculaire ou cardiaque (Guseva Canu *et al.* 2012). Expérimentalement, une contamination à l'uranium par ingestion à très forte concentration (9393 mg/kg/jour) ou à des concentrations de 30 mg/kg/jour pendant 91 jours n'entraîne pas de perturbation du système cardio-vasculaire (Maynard *et al.* 1949, Craft *et al.* 2004). Ces résultats semblent suggérer qu'une exposition à l'uranium n'altère pas les fonctions cardiovasculaires.

1.1.6.2.3 Le foie

Des lésions histologiques et tissulaires sont observées après exposition à fortes concentrations chez le rat (210 mg/kg) (Domingo *et al.* 1987). Une élévation du taux plasmatique des enzymes hépatiques comme les transaminases ALAT (alanine amino transférase) ou ASAT (aspartate amino transférase), ainsi qu'une diminution du taux de triglycérides, ont été décrites après injection sous-cutanée d'uranium à la dose de 11,5 mg/kg/jour pendant 3 jours chez le rat. Ces modifications sont le reflet d'une altération de la perméabilité membranaire et potentiellement de nécrose hépatique (Domingo *et al.* 1987, Gueguen *et al.* 2006). Des modifications des enzymes du métabolisme hépatique, les cytochromes p450 ont aussi été mises en évidence 3 jours après instillation d'uranium

chez le rat (Pasanen *et al.* 1995). Le métabolisme de la vitamine D et du cholestérol est également perturbé suite à un traitement unique par voie orale de nitrate d'uranyle à la dose de 240 mg/kg (Tissandie *et al.* 2006).

Lors d'une exposition chronique par ingestion d'eau de boisson à 9 mg/kg/jour pendant 4 semaines, une augmentation des transaminases est également observée (Ortega *et al.* 1989). Des lésions histologiques au niveau du foie ont été observées après ingestion de 30 mg/kg/jour d'uranium pendant 91 jours (Gilman *et al.* 1998). Comme après exposition aiguë, l'exposition chronique à l'uranium pendant 9 mois à 2 mg/kg/jour entraîne des perturbations dans les enzymes des phases I du métabolisme hépatique (Souidi *et al.* 2005, Gueguen *et al.* 2006). Ces modifications entraînent un dysfonctionnement du métabolisme des xénobiotiques dont le paracétamol (Gueguen *et al.* 2007, Rouas *et al.* 2009). De plus, les cytochromes impliqués dans le catabolisme du cholestérol hépatique ont une expression et une activité moindre après exposition chronique à l'uranium (Racine *et al.* 2010).

1.1.6.2.4 Le cerveau

L'uranium est également connu pour induire des effets sur les fonctions cérébrales qui seront détaillés dans le paragraphe 1.1.8 : Neurotoxicologie de l'uranium. Concernant les effets cancérogènes de l'uranium, des études ont montré une augmentation de décès due à des tumeurs cérébrales (Checkoway *et al.* 1988, Boice *et al.* 2003). Une augmentation du taux de mortalité par cancer du cerveau a été observée sur une cohorte de mineurs d'uranium 55 ans après exposition (Vaquier *et al.* 2011, Rage *et al.* 2014). Par ailleurs, aucune augmentation des cancers au niveau du cerveau n'a été retrouvée chez les vétérans de la guerre du Golfe (MacFarlane *et al.* 2003, Storm *et al.* 2006).

1.1.7 Reprotoxicité de l'uranium

L'exposition à l'uranium entraîne des effets sur les fonctions de reproduction mâles et femelles ainsi que sur le développement embryonnaire et foetal.

1.1.7.1 Effets sur les paramètres reproducteurs

Des études épidémiologiques sur des mineurs de Namibie ont montré une diminution de la concentration circulante de testostérone sans pour autant montrer d'effet pathologique sur les fonctions de reproduction de ces travailleurs (Zaire *et al.* 1997).

D'un point de vue expérimental, la reprotoxicité de l'uranium chez les rats mâles a été évaluée après exposition à 10, 20 et 40 mg/kg/jour pendant 3 mois et a mis en évidence une diminution du nombre de spermatozoïdes accompagnée d'une altération tissulaire des testicules sans modification dans le

poids des testis et de l'épididyme. Suite à l'accouplement de ces mâles exposés à l'uranium appauvri avec des femelles non exposées, une diminution du taux de fécondation a été observée (Linares *et al.* 2005). Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment obtenus par l'équipe de Llobet chez la souris qui ont montré qu'une exposition à l'uranium appauvri à des concentrations de 10, 20, 40 et 80 mg/kg/jour pendant 64 jours induisait également une diminution du taux de fécondation sans perturbation de la spermatogenèse (Llobet 1991). L'exposition à une faible concentration d'uranium appauvri (0,07 mg/kg/jour) pendant 16 semaines diminue le poids des testis et entraîne des lésions testiculaires (Malenchenko *et al.* 1978). Une contamination des rats mâles à l'uranium enrichi à 2 mg/kg/jour entraîne une perturbation dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes testiculaires. Ces effets ne sont pas retrouvés après exposition à l'uranium appauvri (Grignard *et al.* 2007). L'ensemble de ces études montre donc qu'une exposition à l'uranium enrichi à faibles concentrations entraîne des perturbations des fonctions de reproduction chez le mâle qui ne sont pas retrouvées après exposition à l'uranium appauvri, ce qui démontre l'influence de la radiotoxicité de l'uranium à faible concentration.

Chez la femelle, une modification de la maturation des ovocytes a été mise en évidence suite à une contamination par ingestion d'uranium entre 1 et 96 mg/kg/jour pendant 15 à 49 jours chez la souris (Arnault *et al.* 2008, Feugier *et al.* 2008, Kundt *et al.* 2009). Des modifications de la folliculogénèse ont également été décrites après contamination interne à l'uranium naturel (Arnault *et al.* 2008). De plus, une augmentation du poids utérin ainsi qu'une réduction du nombre de follicules primaires ont été observées suite à une contamination à l'uranium appauvri entre 0,12 µg et 6,7 mg/kg/jour pendant 30 jours (Raymond-Whish *et al.* 2007). L'ensemble de ces études suggère qu'une exposition chronique à l'uranium entraîne des modifications dans les fonctions de reproduction chez la femelle.

1.1.7.2 Toxicité sur les femelles gestantes

La toxicité sur les femelles gestantes a été évaluée après contamination par gavage à l'uranium appauvri aux concentrations de 5, 10, 25 et 50 mg/kg/jour entre le 6^e et le 15^e jours de gestation (E6-E15) chez des souris. Cette étude a montré une diminution de la prise de poids et de la prise alimentaire chez les femelles gestantes (Domingo *et al.* 1989). Suite à cette étude, la NOAEL (no observed adverse effect level) pour la toxicité maternelle a été définie en dessous de 5 mg/kg/jour. De plus, une exposition à l'uranium appauvri à forte concentration par ingestion (40 et 80 mg/kg/jour) pendant la gestation et la lactation entraîne une augmentation du gain de poids des femelles et du poids de l'utérus (Sanchez *et al.* 2006).

Une étude par injections répétées d'uranium appauvri à 0,5, 1 et 2 mg/kg/jour pendant la période gestationnelle (E6-E15) a mis en évidence une augmentation du nombre de décès maternels en

fonction de la concentration en uranium, ainsi qu'une diminution du poids corporel à la fin de la gestation (Bosque *et al.* 1993). L'influence du jour d'exposition a également été étudiée chez la souris suite à une injection unique d'uranium appauvri à 4 mg/kg de E9 et E12. Une augmentation du nombre de décès, de fœtus résorbés et de pertes post-implantation est observée à chaque temps d'injection de E9 à E12 avec un pic de sensibilité à E10 (Bosque *et al.* 1993).

1.1.7.3 Toxicités prénatale et postnatale

De nombreuses études ont également démontré que les stades prénatal et postnatal étaient des périodes sensibles à la toxicité de l'uranium. En effet, un taux élevé de létalité embryonnaire et une croissance plus lente des nouveau-nés ont été mis en évidence après une contamination des souris mâles et femelles, avant l'accouplement puis durant la gestation et la lactation, par ingestion d'eau de boisson à des concentrations d'uranium appauvri de 5, 10 et 25 mg/kg/jour (Paternain *et al.* 1989). Chez le fœtus, Domingo et son équipe ont montré que la contamination à l'uranium appauvri par gavage entre les temps embryonnaires E6 et E15 entraîne une diminution du poids du fœtus et une augmentation d'anomalies développementales comme l'apparition de fente palatine, une exencéphalie, des hématomes, une réduction de l'ossification, des fissures congénitales du palais ou encore des malformations du sternum (Domingo *et al.* 1989). Après exposition à de plus fortes concentrations d'uranium appauvri (40 et 80 mg/kg/jour) par ingestion pendant la gestation et la lactation, une diminution du poids des rats à P12 et P21 est observée (Sanchez *et al.* 2006). Par ailleurs, après contamination par ingestion d'aliments contaminés à 4 et 40 mg/kg/jour, l'uranium appauvri n'a pas d'incidence sur le poids des rats des générations F0 et F1 jusqu'à 21 jours postnatals (Hao *et al.* 2012).

Après injections unique (4 mg/kg) ou répétées d'uranium appauvri (0,5, 1 et 2 mg/kg/jour) pendant la période gestationnelle, la fœtotoxicité a été mise en évidence par la diminution du poids des fœtus, l'augmentation de l'incidence de perturbations dans l'ossification ainsi que la présence de fente palatine (Bosque *et al.* 1992, Bosque *et al.* 1993). Ces effets pourraient cependant être reliée à une toxicité de l'uranium sur la femelle gestante, sauf dans le cas de l'apparition de la fente palatine (Kehra 1987). Suite à ces études après injections pendant la période gestationnelle, le stade embryonnaire E10 chez la souris a été décrit comme étant le plus sensible à la toxicité développementale de l'uranium (Bosque *et al.* 1993).

L'ensemble de ces études montre que l'exposition à l'uranium induit une reprotoxicité incluant une toxicité sur les fonctions de reproduction mâles et femelles, une toxicité maternelle, une toxicité embryonnaire et fœtale ainsi que des effets sur la descendance postnatale.

La NOAEL pour la toxicité maternelle de l'embryotoxicité et de la tératogénicité a été déterminée à une concentration inférieure à 5 mg/kg/jour après ingestion chronique et en dessous de 0,5 mg/kg/-jour après injection (Domingo *et al.* 1991). Par conséquent, l'exposition à l'uranium après injection entraîne une toxicité maternelle et embryofœtale plus importante.

1.1.7.4 Passage placentaire de l'uranium

Le placenta est d'une part une barrière protégeant les embryons et les fœtus des substances toxiques auxquelles la mère est exposée. Il est d'autre part à la base des échanges de nutriments entre la mère et les embryons/fœtus, mais il laisse passer aussi de nombreuses substances toxiques (Needham 2010). Il est bien connu que certains métaux lourds, comme le plomb ou le mercure, passent à travers le placenta et s'accumulent dans les embryons et les fœtus (Gundacker *et al.* 2012). En revanche, le passage du cadmium à travers le placenta est limité et dépend du stade de gestation. En effet, le cadmium est capable de passer à travers le placenta pendant le dernier stade de gestation suite à la diminution de la métallothionéine, protéine impliquée dans la détoxification des métaux lourds (Chisolm *et al.* 1987, Benitez *et al.* 2009).

Concernant l'uranium, très peu d'études sur son passage placentaire ont été réalisées. Après une injection intra-veineuse d'uranium appauvri pendant les périodes de gestation E15-E19 et E19-E20, les quantités d'uranium retrouvées dans le placenta et dans les fœtus sont très faibles et relativement identiques (Sikov *et al.* 1968). Après exposition pendant la gestation à de fortes concentrations de 40 et 80 mg/kg/jour, une accumulation d'uranium appauvri est observée dans le placenta avec une quantité mesurée respectivement de $19,72 \pm 10,24$ ng/g et $34,59 \pm 17,67$ ng/g. Les fœtus au stade E14 accumulent également de l'uranium appauvri avec des quantités mesurées de $3,57 \pm 1,75$ ng/g à la concentration de 40 mg/kg/jour et $5,48 \pm 3,36$ ng/g après exposition à 80 mg/kg/jour (Sanchez *et al.* 2006). Enfin, suite à l'implantation de 4 (120 mg), 8 (240 mg) ou 12 (360 mg) fragments d'uranium appauvri dans le muscle avant l'accouplement, l'uranium est retrouvé dans le placenta et dans les fœtus au temps embryonnaire E20 quel que soit le nombre de fragments implantés (Benson *et al.* 1997). Ces résultats suggèrent que l'uranium à forte concentration est capable de passer à travers le placenta, mais en relativement faible quantité.

1.1.8 Neurotoxicité de l'uranium

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études ont montré que le cerveau était aussi un organe cible de la toxicité de l'uranium. Dans cette partie seront décrits l'accumulation de l'uranium dans le cerveau et les structures cérébrales, les mécanismes de son passage dans le cerveau, ses effets sur les fonctions cérébrales et les mécanismes moléculaire et cellulaire connus pouvant être responsables de ces effets suite à une exposition par ingestion, inhalation, instillation, injection et implantation.

Au cours de ma thèse, une revue a été rédigée sur la neurotoxicité de l'uranium et publiée dans *Neurotoxicology* (Dinocourt *et al.* 2015).

1.1.8.1 Accumulation de l'uranium dans le cerveau

La distribution de l'uranium dans les structures cérébrales est hétérogène et dépend de la concentration d'uranium, de sa spéciation, de la voie d'exposition, ainsi que de la durée d'exposition.

1.1.8.1.1 Cerveau entier

De nombreuses études ont mis en évidence la présence d'uranium dans le cerveau après exposition, que ce soit par ingestion, par inhalation ou par pénétration transcutanée.

Trois jours après une injection intra péritonéale d'uranium appauvri chez le rat à une concentration de 144 ± 10 µg d'uranium par kg, le cerveau contient des traces d'uranium à une teneur de 1,3 ng d'uranium par grammes (ng/g) de tissu. Cependant, après une exposition à une concentration de 70 ± 8 µg d'uranium par kg, l'uranium n'est pas détecté dans le cerveau (Lestaevel *et al.* 2005).

Après exposition sub-chronique à l'uranium appauvri par ingestion d'eau de boisson pendant 4 semaines, l'uranium s'accumule dans le cerveau entier à une teneur de 478 ± 110 ng/g après exposition à 8 mg/kg/jour et de 588 ± 100 ng/g après exposition à 16 mg/kg/jour (Ortega *et al.* 1989). De même, après contamination chronique à l'uranium appauvri à une concentration de 0,06 à 36,73 mg/kg/jour, une teneur en uranium de 430 ng/g est retrouvée dans le cerveau pour la plus forte concentration (Gilman *et al.* 1998). Après ingestion quotidienne d'uranium appauvri pendant 3 mois à une concentration de 10, 20 ou 40 mg/kg/jour, les teneurs en uranium retrouvées dans le cerveau sont respectivement de $4,97 \pm 2,35$ ng/g, $2,32 \pm 1,39$ ng/g et $13,89 \pm 9,37$ ng/g de cerveau (Belles *et al.* 2005). L'équipe de Paquet a montré une accumulation d'uranium appauvri entre 0,07 et 1,1 ng/g après une exposition entre 95 et 570 jours par eau de boisson contaminée à une concentration de 2 mg/kg/jour (Paquet *et al.* 2006). Ces résultats montrent un passage de l'uranium dans le cerveau entier après différents types d'exposition. Cependant, en fonction du mode d'exposition, l'uranium ne se retrouve pas dans le cerveau en mêmes quantités. Ces différences peuvent être dues à la spéciation chimique de l'uranium, qui est différente en fonction du mode d'exposition.

1.1.8.1.2 Structures cérébrales

L'uranium a également été détecté dans des structures cérébrales spécifiques après différents modes d'exposition.

Après une injection aiguë d'uranium appauvri à une concentration de 1 mg/kg, la distribution d'uranium dans les différentes structures du cerveau est hétérogène. En effet, 8 heures après injection,

l'uranium est retrouvé dans le striatum ($17,7 \pm 3,0$ ng/g), dans l'hippocampe ($9,8 \pm 1,9$ ng/g), dans le cervelet ($6,1 \pm 0,9$ ng/g) et dans le cortex ($4,2 \pm 0,8$ ng/g) (Barber *et al.* 2005). Une étude similaire a montré qu'une injection d'uranium appauvri à la même concentration avait mis en évidence une plus forte concentration d'uranium dans l'hippocampe (10 ng/g) et une plus faible concentration dans le striatum (4 ng/g) (Houpert *et al.* 2007).

Trois ou six mois après implantation de 4 à 20 fragments (120 à 600 mg d'uranium appauvri) dans un muscle, une accumulation d'uranium est observée dans le cervelet, le tronc cérébral dans le striatum et le cortex (Fisanakis *et al.* 2006). Dix-huit mois après implantation, l'uranium se distribue dans le cortex ($25,9 \pm 11,1$ ng/g), le cortex frontal ($38,9 \pm 7,4$ ng/g), l'hippocampe ($40,4 \pm 77,7$ ng/g), le mésencéphale ($50,9 \pm 16,6$ ng/g) et dans le cervelet ($96,3 \pm 42,6$ ng/g) pour la plus forte dose d'uranium (Pellmar *et al.* 1999a, Pellmar *et al.* 1999b).

Après exposition chronique pendant 45 jours par ingestion d'eau de boisson à 2 mg/kg/jour, l'uranium appauvri se retrouve préférentiellement dans le striatum ($3,7 \pm 0,5$ ng), dans l'hippocampe ($3,9 \pm 0,5$ ng/g) et dans l'hypothalamus ($3,6 \pm 0,5$ ng/g) (Lestaevel *et al.* 2005, Houpert *et al.* 2007). Après ingestion chronique pendant 9 mois, l'uranium appauvri est distribué de façon hétérogène avec la plus forte concentration retrouvée dans le striatum (49 ng/g) et la plus faible concentration dans le cortex (7 ng/g) (Houpert *et al.* 2007). Linares et son équipe ont montré une distribution ascendante d'uranium appauvri (cortex < cervelet < hippocampe) après trois mois d'exposition par ingestion aux concentrations de 10, 20 et 40 mg/kg/jour (Linares *et al.* 2007).

Vingt-quatre heures après la fin d'inhalations répétées durant trois semaines, la plus forte concentration d'uranium appauvri a été retrouvée dans les bulbes olfactifs (567 ng/g) (Houpert *et al.* 2007). De plus, quatre heures après instillation d'uranium dans la cavité nasale des rats à des concentrations de 0,01 à 10 mg/mL, de l'uranium a été retrouvé dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet. Dans les bulbes olfactifs, les teneurs en uranium retrouvées après instillation sont respectivement de $2,4 \pm 0,3$ ng/g et $168,9 \pm 40,2$ ng/g (Ibanez *et al.* 2014).

L'ensemble de ces résultats montre la présence d'uranium dans le cerveau après exposition. De plus, l'hippocampe semble être une structure accumulant préférentiellement l'uranium quel que soit le mode d'exposition.

1.1.8.2 Mécanismes de passage de l'uranium dans le cerveau

Différents mécanismes de passage ont été proposés afin d'expliquer la présence d'uranium dans le cerveau. L'équipe de Lemerrier a montré que l'uranium appauvri n'affectait pas l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et a suggéré un possible transfert vasculaire de l'uranium (Lemerrier *et al.* 2003). Le mécanisme de transfert du sang au cerveau reste néanmoins méconnu.

Pellmar et Fisanakis ont émis l'hypothèse que l'uranium pourrait utiliser des transporteurs de types transferrine, ferritine ou DMT1, connus pour être présents dans le cerveau (Pellmar *et al.* 1999, Fisanakis *et al.* 2006).

Après inhalation ou instillation d'uranium, une autre voie de passage de la cavité nasale jusqu'aux bulbes olfactifs a été suggérée (Monleau *et al.* 2005, Tournier *et al.* 2009). Ce passage direct se ferait *via* le fluide cérébrospinal le long du nerf olfactif (Ibanez *et al.* 2013).

Ces études ont montré la présence d'uranium dans le cerveau, mais n'ont pas déterminé sa localisation cellulaire ou subcellulaire. Il a été récemment montré que l'uranium était retrouvé au niveau de la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe (Sussulini et Becker 2015). Une étude *in vitro* sur une lignée de cellules neuronales (IMR-32) exposées à de faibles doses a localisé la présence d'uranium principalement dans les noyaux des cellules (Rouas *et al.* 2010).

Ces données mettent donc en évidence plusieurs mécanismes de passage possible de l'uranium dans le cerveau. Cependant, d'autres investigations sont nécessaires pour décrire les mécanismes exacts de transfert.

1.1.8.3 L'uranium et troubles des fonctions cérébrales

L'uranium est un métal lourd ayant une neurotoxicité et étant connu pour engendrer des troubles du comportement.

1.1.8.3.1 Études épidémiologiques

Des états de dépression, d'agitation ou encore des perturbations moteur ou dans le langage (Howland 1948), ainsi que des pertes de mémoire, des problèmes visuels et une exacerbation de la fatigue (Kathren et Moore 1986) ont été observés chez des travailleurs exposés par inhalation à de fortes concentrations d'uranium (40-50 mg d'uranium naturel).

Des études épidémiologiques sur des vétérans de la guerre du Golfe, exposés essentiellement par blessure et incorporation de fragments d'uranium appauvri, ont mis en évidence une diminution des capacités cognitives 7 ans après l'exposition à l'uranium. Cette diminution est corrélée avec un taux élevé d'uranium au niveau urinaire (Mc Diarmid *et al.* 2002). Cependant, des études à plus long terme révèlent que 12 à 20 ans après exposition ces effets ne sont pas confirmés (Mc Diarmid *et al.* 2006, Squibb et Mc Diarmid 2006, Mc Diarmid *et al.* 2007, Mc Diarmid *et al.* 2009, Mc Diarmid *et al.* 2011, Mc Diarmid *et al.* 2013). De plus, les fragments retrouvés ne contiennent pas que de l'uranium, mais également du plomb, du zinc, du fer et du cuivre (Squibb *et al.* 2012) qui peuvent conduire également à des troubles cognitifs. De plus, les vétérans ont subi de nombreux troubles

psychologiques et stress pendant la guerre qui peuvent exacerber les troubles cognitifs observés. Les troubles comportementaux mis en évidence peuvent donc avoir plusieurs origines.

Un autre cas de contamination à l'uranium a été reporté chez un homme exposé quotidiennement à une barre d'uranium sous forme de presse-papier pendant 3 ans. Les examens biologiques et cliniques de cet homme ont révélé la présence d'uranium dans ses fèces et ont montré des pertes d'équilibre, des faiblesses musculaires ainsi qu'une atrophie des membres (Goasguen *et al.* 1982).

Ces données démontrent que d'autres études épidémiologiques sont nécessaires pour établir un lien direct entre l'exposition à l'uranium et les troubles cognitifs. Les études expérimentales réalisées sur l'uranium permettent d'étayer les conclusions de ces études épidémiologiques.

1.1.8.3.2 Effets de l'uranium sur le comportement à l'âge adulte

Des études expérimentales ont donc été conduites afin d'évaluer les effets de l'uranium sur le comportement avec différents modes d'exposition (l'ingestion, l'inhalation et l'injection), différentes concentrations, spéciations et isotopes de l'uranium. Ces données ont mis en évidence quatre catégories majeures de troubles observés, à savoir des troubles de la locomotion, du cycle veille sommeil, des perturbations de la mémoire ainsi que des troubles de l'anxiété.

1.1.8.3.2.1 Locomotion

Après inhalation de particules d'uranium appauvri entre 0,5 et 18 mg d'uranium par m³ à raison de 8 heures par jour et 5 jours par semaine pendant 5 semaines, des signes neurologiques ont été observés, tels qu'une instabilité dans la marche et une lassitude chez des chiens et des chats (Berke et Rothstein 1949). Des troubles locomoteurs ont aussi été observés chez le rat 1 jour après inhalation de 190 mg d'uranium appauvri par m³ à raison de 30 minutes par jour et de 4 jours par semaine pendant 3 semaines (Monleau *et al.* 2005).

Cent cinquante jours après implantation de 4 ou 20 fragments d'uranium appauvri dans le muscle de rats, ceux-ci ne présentent pas de troubles de l'activité locomotrice, ni des réflexes auditifs et de l'interaction sociale (Arfsten *et al.* 2007). En revanche, des injections répétées à la concentration de 0,1 ou 1 mg d'uranium appauvri par kg pendant 7 jours perturbent la coordination motrice des rats (Abou-Donia *et al.* 2002).

Une augmentation de l'activité locomotrice seulement chez les rats mâles a été mise en évidence dans plusieurs études dans lesquelles les rats boivent de l'uranium appauvri à raison de 4, 8 ou 10 mg/kg par jour pendant 2 semaines, 3 et 6 mois (Belles *et al.* 2005, Briner et Murray 2005).

Ces études montrent donc que l'uranium induit des perturbations locomotrices après différents mode de contamination.

1.1.8.3.2.2 Cycle veille/sommeil

Une diminution de la quantité de sommeil paradoxal a été observée 3 jours après injection de 144 µg d'uranium appauvri par kg. Cet effet est dû à une diminution du nombre et de la durée des phases du sommeil paradoxal (Lestaevel *et al.* 2005).

Après ingestion d'uranium enrichi à la concentration de 2 mg/kg par jour pendant 1 et 2 mois ont montré une augmentation du sommeil paradoxal chez le rat. Cette augmentation est due à une augmentation du nombre de phases de sommeil paradoxal et non à une augmentation de la durée de cette phase (Born *et al.* 1991).

1.1.8.3.2.3 Fonctions cognitives

L'uranium induit également des troubles des fonctions cognitives. L'injection intra musculaire à la dose de 1 mg d'uranium appauvri par kg engendre des troubles rapides mais transitoires de la mémoire de travail (Barber *et al.* 2007). Une diminution de cette mémoire a aussi été observée 6 jours après inhalation de 190 mg d'uranium appauvri par m³ pendant 3 semaines (Monleau *et al.* 2005).

L'exposition chronique à l'uranium enrichi 4 % à la concentration de 2 mg/kg pendant 1,5, 3 et 9 mois entraîne une diminution de la mémoire spatiale (Houpert *et al.* 2005, Houpert *et al.* 2007). L'exposition à l'uranium appauvri dans les mêmes conditions n'entraîne pas de perturbation de la mémoire spatiale (Houpert *et al.* 2005). Ces résultats montrent que l'uranium enrichi affecte la mémoire médiée par l'hippocampe.

Chez des souris pour lesquelles le gène de l'apolipoprotéine E, un transporteur de lipides étant facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer, a été inhibé, l'exposition à 2 mg/kg/jour d'uranium appauvri pendant 3 mois entraîne également une diminution de la mémoire spatiale, indiquant que l'exposition à l'uranium aurait un effet accélérateur des troubles liés à la maladie d'Alzheimer (Lestaevel *et al.* 2014).

1.1.8.3.2.4 Troubles émotionnels

Très peu d'études se sont intéressées aux troubles émotionnels induits par l'exposition à l'uranium. Néanmoins, une augmentation de l'anxiété a été mise en évidence chez des rats exposés à l'uranium enrichi à 2 mg/kg/jour pendant 45 jours alors que dans les mêmes conditions, l'uranium appauvri n'induit aucun effet significatif (Houpert *et al.* 2005). Le comportement de type dépressif ne semble

pas modifié suite à l'ingestion d'uranium enrichi à 2 mg/kg/jour pendant 3, 6 ou 9 mois (Houpert *et al.* 2007).

L'ensemble de ces études a donc mis en évidence des effets de l'uranium sur les fonctions cérébrales après exposition à l'âge adulte. L'uranium enrichi semble engendrer plus d'effets que l'uranium appauvri dans les mêmes conditions expérimentales.

1.1.8.4 Effets de l'uranium sur le comportement au cours du développement

Toutes les études citées précédemment ont été menées sur des animaux exposés à l'âge adulte. Cependant, au cours du développement, le cerveau est plus sensible aux perturbations extérieures (Eriksson *et al.* 2010). Peu d'études ont été réalisées sur les effets d'une contamination à l'uranium pendant le développement du cerveau. Briner et Abboud ont montré que des souris exposées à l'uranium appauvri à la concentration de 4 mg/kg/jour durant les périodes de gestation et de lactation présentent une diminution de leur activité locomotrice à l'âge de 3 semaines (Briner et Abboud 2002). L'exposition maternelle à l'uranium enrichi à la concentration de 2 mg/kg/jour pendant ces mêmes périodes entraîne une augmentation de l'activité exploratoire à 5 et 9 mois. Ces animaux ont également leur mémoire spatiale diminuée à l'âge de 2 mois (Houpert *et al.* 2007).

Une exposition à l'uranium appauvri, à partir de la naissance à la concentration de 80 mg/kg/jour, entraîne aussi des troubles dans les profils d'apprentissage entre P10 et P13 (Albina *et al.* 2005). De plus, une diminution dans la reconnaissance d'objet et une augmentation de l'anxiété et du comportement dépressif sans modification de la mémoire spatiale ont été observées suite à une exposition à l'uranium appauvri à 2 mg/kg/jour pendant 2 mois à partir de la naissance (Lestaevel *et al.* 2013, Lestaevel *et al.* 2015).

Ces résultats suggèrent que l'exposition à l'uranium pendant le développement du cerveau a un impact sur les fonctions comportementales à l'âge adulte. De plus, à l'âge adulte, les effets sont majoritairement observés après exposition à l'uranium enrichi alors qu'au cours du développement des effets de l'uranium appauvri ont été observés. Cependant, que ce soit à l'âge adulte ou au cours du développement, les mécanismes d'actions responsables de ces effets sont encore mal connus.

1.1.9 Mécanismes cellulaire et moléculaire des effets centraux de l'uranium

Les principaux mécanismes par lesquels l'uranium induit les troubles décrits ci-dessus sont abordés dans cette partie.

1.1.9.1 Stress oxydant

L'implication de la balance pro et anti-oxydante dans les effets de l'uranium sur les fonctions cérébrales a été explorée. Le stress oxydant correspond à un déséquilibre de la balance pro et anti-oxydante. La régulation du stress oxydant passe par un ensemble de facteurs, parmi lesquels les enzymes anti-oxydantes, dont les principales sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion reductase (GR).

Le cerveau possède peu de défense anti-oxydante, il est donc particulièrement sensible à ce stress. De plus, il est riche en acide gras polyinsaturé, principale source de peroxydation lipidique. Chez le rat, une augmentation de la peroxydation lipidique a été mise en évidence après injection intrapéritonéale de 576 µg/kg d'uranium appauvri pendant 3 jours (Ghosh *et al.* 2007), ainsi qu'après ingestion chronique d'uranium appauvri à 150 mg/L pendant 2 semaines et 6 mois (Briner et Murray 2005). Après une contamination à l'uranium enrichi (4 %) à une concentration de 2 mg/kg/jour pendant 9 mois, une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau du cortex entorhinal a été observée, mais pas après contamination à l'uranium appauvri (Lestaevel *et al.* 2009). Une contamination à l'uranium appauvri à plus forte concentration (10, 20 et 40 mg/kg/jour) pendant 3 mois augmente la peroxydation lipidique au niveau du cortex cérébral et du cervelet mais pas au niveau de l'hippocampe (Linares *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats montre que l'exposition à l'uranium entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique dans des régions spécifiques du cerveau et suggère que les membranes cellulaires sont affectées par l'induction d'un stress oxydant causé par l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène.

Chez le rongeur adulte, plusieurs études au niveau des structures cérébrales ont mis en évidence une perturbation des enzymes anti-oxydantes.. L'expression génique et l'activité de la SOD, de la CAT ou de la GPx sont augmentées au niveau du cortex entorhinal après ingestion chronique d'uranium appauvri. Au contraire, l'ingestion d'uranium enrichi entraîne une diminution de ces enzymes anti-oxydantes (Lestaevel *et al.* 2009). Une contamination à l'uranium appauvri à la concentration de 40 mg/kg/jour pendant 3 mois diminue l'activité de la GPx dans le cortex. Dans le cervelet, une augmentation de l'activité de la GPx à 40 mg/kg/jour ainsi qu'une augmentation du glutathion oxydé (GSSG) et une diminution du glutathion réduit (GSH) ont été mises en évidence à toutes les concentrations. Dans l'hippocampe, une diminution de la GSH a été observée suite à l'ingestion de 20 mg/kg/jour d'uranium appauvri (Linares *et al.* 2007). Plus récemment, une étude après une exposition par ingestion à 2 mg/kg/jour à partir de la naissance et pendant 10 semaines a montré une augmentation de l'activité de la SOD et de la GPx au niveau de l'hippocampe des ratons (Lestaevel *et al.* 2014). Ces résultats montrent, entre autres, que le métabolisme du glutathion semble être une cible de l'uranium au niveau cérébral.

La voie de l'oxyde nitrique (NO) joue aussi un rôle dans le stress oxydant. Le NO est une espèce réactive de l'oxygène. À faible concentration, le NO joue un rôle protecteur et de régulation des fonctions cellulaires, mais il a des effets toxiques à fortes concentrations. L'injection répétée d'uranium appauvri à une dose de 0,1 mg/kg pendant 7 jours induit une augmentation de taux de NO dans le cortex et dans le mésencéphale, alors qu'il est réduit après une injection de 1 mg/kg ([Abou-Donia et al. 2002](#)). Une augmentation de la NO synthase a été observée dans le cortex entorhinal après ingestion chronique à l'uranium appauvri pendant 9 mois ([Lestaevel et al. 2009](#)). Ces résultats montrent que la voie du NO semble aussi être perturbée par l'uranium et peut avoir soit un effet protecteur soit un effet neurotoxique dépendant de la dose et de la voie d'exposition.

L'ensemble de ces résultats montre qu'une contamination à l'uranium induit un déséquilibre de la balance pro/anti-oxydante. Néanmoins, l'uranium induit des effets dépendants de la structure cible et du temps d'exposition, de la concentration d'uranium et de sa spéciation. Une modulation de la défense anti-oxydante est observée et suggère la mise en place de réponses différentes du système nerveux central au stress oxydant après contamination à l'uranium appauvri, mais pas à l'uranium enrichi. Ces résultats mettent ainsi en avant l'importance de la double toxicité chimique et radiologique de l'uranium ([Lestaevel et al. 2009](#)).

1.1.9.2 Neurotransmetteurs

1.1.9.2.1 Acétylcholine

Parmi les autres mécanismes d'actions étudiés, les voies de synthèse et de dégradation des neurotransmetteurs jouent un rôle important. Les neurotransmetteurs sont des substances chimiques qui assurent la transmission des messages nerveux d'un neurone à l'autre au niveau des synapses. Ces molécules jouent donc un rôle fondamental dans de nombreux processus neurophysiologiques. Les principaux neurotransmetteurs explorés sont l'acétylcholine (ACh), la sérotonine et la dopamine.

Chez le rongeur adulte, des perturbations du système cholinergique ont été mises en évidence après contamination chronique à l'uranium appauvri. L'ACh est impliquée dans les fonctions cognitives supérieures comme les fonctions d'apprentissage ou de mémoire ([Drever et al. 2010](#)) et dans le cycle veille/sommeil ([Steriade 2004](#)). La régulation de la neurotransmission cholinergique se fait par la synthèse et la libération de l'ACh *via* l'acétylcholine transférase et la destruction de l'ACh par l'acétylcholinestérase (AChE). L'ACh et son récepteur sont également impliqués dans les activités locomotrice et sensorimotrice ([Gerber et al. 2001](#)).

Après un mois et demi d'exposition par ingestion d'eau de boisson contaminée à l'uranium appauvri à 2 mg/kg/jour, le taux d'acétylcholine est diminué de 22 % au niveau du cortex entorhinal. Cette diminution est associée à une augmentation de 20 % de l'activité de l'acétylcholinestérase ([Bens-](#)

[soussan et al. 2009](#)). Cependant, l'activité de l'AChE n'est pas modifiée dans le cortex frontal des rats exposés à l'uranium appauvri pendant 6 mois ([Bussy et al. 2006](#)). Dans le cervelet, l'exposition chronique à l'uranium appauvri par ingestion d'eau de boisson diminue l'activité de l'AChE ([Bussy et al. 2006](#)). Aucune modification de l'activité de l'AChE n'est observée dans l'hippocampe, mais l'expression génique de l'AChE ou du récepteur muscarinique de type 1 (AChR M1) est modifiée après expositions sub-chronique et chronique à l'uranium appauvri ([Benssoussan et al. 2009](#)). De plus, une injection intramusculaire répétée d'uranium appauvri à 0,1 et 1 mg/kg pendant 7 jours n'a pas d'effet sur l'activité de l'AChE ([Abou-Donia et al. 2002](#)). Une étude récente après une exposition depuis la naissance jusqu'à 10 semaines à l'uranium appauvri à 2 mg/kg/jour a montré une diminution de 14 % du taux d'acétylcholine, ainsi que de l'activité de l'acétylcholinestérase dans le cortex entorhinal mais aucune modification n'est observée dans l'hippocampe ([Lestaevel et al. 2013](#)).

Ces résultats montrent que les effets sur l'expression des gènes impliqués dans le système cholinergique après exposition chronique à l'uranium appauvri semblent opposés entre le cortex et l'hippocampe. Le système cholinergique semble être plutôt inhibé dans le cortex, alors que l'hippocampe n'est pas impacté. Les effets de l'uranium sur ce système dépendent donc de la structure étudiée, de la voie et de la durée d'exposition ainsi que de la concentration en uranium.

1.1.9.2.2 Monoamines

Le système sérotoninergique, impliqué dans le cycle veille/sommeil, la douleur, l'anxiété ou encore dans la dépression ([Monti 2011](#), [Meneses et Liy-Salmeron 2012](#), [La Fleur et Serlie 2014](#)) est également perturbé après contamination à l'uranium appauvri. En effet, une contamination à l'uranium appauvri à 2 mg/kg/jour par eau de boisson pendant 9 mois entraîne une diminution du métabolite 5HIAA (acide 5-hydroxyindolacétique) de la sérotonine au niveau cortical, sans entraîner de perturbation du taux de sérotonine. Aucune modification du système sérotoninergique n'est observée dans l'hippocampe et le striatum suite à l'ingestion d'uranium appauvri ([Bussy et al. 2006](#)).

Le système dopaminergique impliqué dans les fonctions locomotrices ([Schultz 2007](#)) est aussi perturbé après contamination à l'uranium appauvri. En effet, une contamination à l'uranium appauvri à la dose de 2 mg/kg/jour pendant un mois et demi entraîne une diminution du taux de dopamine dans l'hypothalamus, mais aucune modification du système dopaminergique n'est observée dans l'hippocampe ([Bussy et al. 2006](#)). Le ratio DOPAC/DA (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid / dopamine) diminue dans le cortex cérébral après 6 mois et dans le striatum après 9 mois d'exposition à l'uranium appauvri par ingestion ([Bussy et al. 2006](#)). Le taux de dopamine diminue transitoirement dans le striatum 3 jours après une injection intramusculaire d'uranium appauvri à la doses de 1 mg/kg et retourne à la normal 7 jours après injection ([Barber et al. 2007](#)). [Houpert et al.](#) ont montré que le

système dopaminergique n'était pas altéré au niveau du cortex, du striatum, de l'hippocampe ou du cervelet après contamination par ingestion durant 1 mois à la concentration de 2 mg/kg/jour d'uranium appauvri (Houpert *et al.* 2004).

Ces résultats montrent des modifications sur le métabolisme des monoamines après exposition à l'uranium qui dépendent de la structure et du mode de contamination. De plus, la diminution du taux de monoamines serait due à une diminution de leur synthèse.

1.1.9.3 Propriétés neurophysiologiques

Des modifications dans les propriétés électrophysiologiques conduisant à une diminution de l'excitabilité neuronale ont été mises en évidence dans l'hippocampe de rat exposés à des fragments (120, 300 et 600 mg) d'uranium appauvri en intramusculaire pendant 6 et 12 mois (Pellmar *et al.* 1999). Ce résultat suggère que l'uranium pourrait modifier l'efficacité de la transmission synaptique.

Des modifications dans l'hippocampe des oscillations de type β/γ jouant un rôle dans les processus de mémorisation (Fries *et al.* 2001, Persaran *et al.* 2002) ont été observées chez des rats âgés de 2 mois exposés à l'uranium appauvri à partir de la naissance à la concentration de 2 mg/kg/jour (Dinocourt *et al.* 2015). Il a été démontré qu'une diminution des activités β/γ serait associée à des altérations dans la reconnaissance d'objets (Steullet *et al.* 2010). Cette étude suggère que l'uranium pourrait altérer la reconnaissance d'objets des animaux, comme observé par l'équipe de Lestaevel (Lestaevel *et al.* 2013) par modification de activités électriques. Cependant, d'autres investigations sont nécessaires pour confirmer ces données.

The neurotoxicology of uranium (août 2015, Toxicology).

Dinocourt C, Legrand M, Dublineau I, Lestaevel P



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Review

The neurotoxicology of uranium

Céline Dinocourt¹, Marie Legrand, Isabelle Dublineau², Philippe Lestaevel*

Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), Pôle de la Radioprotection de l'Homme, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale, BP 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2015

Received in revised form 5 August 2015

Accepted 11 August 2015

Available online 12 August 2015

Keywords:

Sleep

Locomotion

Cognition

Oxidative stress

Neurophysiology

Uranyl

ABSTRACT

The brain is a target of environmental toxic pollutants that impair cerebral functions. Uranium is present in the environment as a result of natural deposits and release by human applications. The first part of this review describes the passage of uranium into the brain, and its effects on neurological functions and cognitive abilities. Very few human studies have looked at its cognitive effects. Experimental studies show that after exposure, uranium can reach the brain and lead to neurobehavioral impairments, including increased locomotor activity, perturbation of the sleep-wake cycle, decreased memory, and increased anxiety. The mechanisms underlying these neurobehavioral disturbances are not clearly understood. It is evident that there must be more than one toxic mechanism and that it might include different targets in the brain. In the second part, we therefore review the principal mechanisms that have been investigated in experimental models: imbalance of the anti/pro-oxidant system and neurochemical and neurophysiological pathways. Uranium effects are clearly specific according to brain area, dose, and time. Nonetheless, this review demonstrates the paucity of data about its effects on developmental processes and the need for more attention to the consequences of exposure during development.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	59
2. Part I: brain accumulation and behavioral effects	59
3. The mechanisms of uranium passage into the brain and its localization	59
4. Behavioral effects	62
4.1. Epidemiological studies	62
4.2. Experimental studies on animals exposed to uranium during adulthood	62
4.2.1. Effect on locomotion	62
4.2.2. Effects on the sleep-wake cycle	63
4.2.3. Effects on cognitive functions	63
4.3. Effects on animals exposed to uranium during development	63
5. Conclusion	63
6. Part II: cellular and molecular mechanisms underlying the effects of uranium	64
7. Mechanistic pathways in adult brains	64
7.1. Oxidative stress	64
7.2. Neurotransmitter pathways	66
7.2.1. Cholinergic system and neurobehavioral functions	66
7.2.2. Monoamine metabolism	66
7.3. Neurophysiological properties	67
8. Mechanistic pathways in brains “under construction”	68
8.1. Conclusion	68

* Corresponding author. Fax: +33 1 58 35 84 67.

E-mail addresses: celine.dinocourt@irsn.fr (C. Dinocourt), marie.legrand@irsn.fr (M. Legrand), isabelle.dublineau@irsn.fr (I. Dublineau), philippe.lestaevel@irsn.fr (P. Lestaevel).¹ Present address: IRSN, Direction de la Stratégie du Développement et des Partenariats, Service Programmes et Stratégies Scientifiques.² Present address: IRSN, Pôle de la Radioprotection de l'Homme.

9. Major conclusions and future investigations	68
Acknowledgments	69
References	69

1. Introduction

An extensive literature has already documented the deleterious effects of environmental toxic pollutants such as metals on the brain and nervous system (Liu and Lewis, 2014). Uranium is the heaviest naturally occurring metallic element and is found in the Earth's crust. Due to its presence in soil, rocks, surface and underground water, air, plants, and animals, it occurs in trace amounts in many foods and in drinking water. Its release into the environment raises questions about its effects on human health (ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2013). Natural uranium contains three isotopes: uranium-238, uranium-235, and uranium-234. An 'enriched' form of uranium, in which the uranium-235 concentration is enhanced, is required to produce energy both in nuclear reactors and nuclear weapons. The remaining uranium mixture (after the enriched uranium is removed) has reduced concentrations of the uranium-235 and uranium-234 isotopes; this is known as depleted uranium. The relatively high availability and low cost of depleted uranium have led to the development of various civilian and military applications (Bleise et al., 2003). Toxicity due to uranium is radiological, because the element emits radiations, and also chemical due to its being a heavy element. Because depleted and natural uranium produces very little radioactivity per mass of uranium, the health effects from exposure of humans and animals to uranium are usually attributed to the chemical properties of uranium.

After exposure to uranium, some target organs of toxicity have been identified, such as kidneys, liver, lungs and brain. It is well known that the uranium toxicity threshold varies also according to the time and the route of its exposure.

Several human populations may be exposed to uranium, notably workers involved in one of the different stages of the nuclear fuel cycle leading to the production of electricity from uranium in nuclear power reactors: exploration, uranium mining, milling, uranium conversion, enrichment, fabrication of nuclear fuel and reprocessing. In addition to these workers, Gulf war and Balkan Veterans were exposed to depleted uranium used in munitions and armors that were extensively used from the 1991 Gulf War (Bleise et al., 2003) as well as populations living in environment affected by depleted uranium-munitions use. Finally, general public may be exposed to uranium in some countries and counties with high natural uranium levels in drinking water (Canu et al., 2011).

For all these reasons, uranium has been the subject of several studies, particularly on its health effects. So, our review discusses the available data published in the last 10 years on uranium effects on cerebral functions. We therefore wrote two parts: the first describes the passage of uranium into the brain and its impact on behavior, while the second focuses on the cellular and molecular mechanisms of action underlying its central effects.

2. Part I: brain accumulation and behavioral effects

Uranium is primarily an alpha emitter and represents a radiation hazard only after internal exposure. Uranium enters the human body by ingestion and inhalation of airborne uranium-containing dust particles or aerosols. Uranium is absorbed from the intestine or the lungs, enters the bloodstream, and is rapidly deposited in the tissues, predominantly kidneys and bone, or excreted in the urine. Uranium's major adverse effect is renal

toxicity after acute exposure (Fukuda et al., 2006), which is more difficult to demonstrate after chronic exposure (Poisson et al., 2014). Concerning the brain, uranium content was measured in whole brain or in specific cerebral structures following different types of exposure: intraperitoneal injection (Lestaevél et al., 2005b), ingestion via drinking water (Bellés et al., 2005; Gilman et al., 1998; Ortega et al., 1989; Paquet et al., 2006), inhalation (Houpert et al., 2007c; Monleau et al., 2005) and following implanted depleted uranium pellets (Pellmar et al., 1999b). A real accumulation of uranium in cerebral structures was not always demonstrated after ingestion, since studies reported comparable uranium quantity in uranium-contaminated animals and uncontaminated animals (Houpert et al., 2005; Lestaevél et al., 2005a, 2009). Nevertheless some cerebral structures, such as striatum, cortex or hippocampus, accumulate more uranium than others (Barber et al., 2005; Paquet et al., 2006). Several studies indicated the absence of a clear dose-dependent accumulation of uranium (Bellés et al., 2005; Dublineau et al., 2014; Gilman et al., 1998; Ortega et al., 1989). Finally, uranium accumulation was clearly observed at long term in rats with implanted depleted uranium-pellets (Fitsanakis et al., 2006; Pellmar et al., 1999a,b). Thus, the issue on the uranium presence in central nervous system is still on the table and deserves further investigations to resolve it. Differential mechanisms of passage have been proposed to explain this cerebral presence of uranium.

3. The mechanisms of uranium passage into the brain and its localization

A possible vascular transfer of uranium has been suggested by only a study carried out by Lemercier et al. (2003) showing that uranium did not impair the integrity of the blood–brain barrier (BBB). In vitro, uranium does not induce toxicity on RBE4 cells (Dobson et al., 2006). The mechanism of the blood–brain transfer, however, remains unknown. Uranium may bind with other metals transporters, i.e. transferrin, ferritin or transporter divalent metal type 1 (DMT1), known to be not evenly spread on the brain (Hémadi et al., 2010; Konietzka et al., 2014). In the bone, Basset et al. (2013) suggest that fetuin A is a major protein target for uranium (Basset et al., 2013). Thus uranium could use similar transporters or blood proteins to pass through the brain barrier as demonstrated in other organs. These assumptions have not been confirmed yet and need more investigations with in vitro BBB models.

After inhalation or instillation exposure of rats, uranium is transferred directly from the nasal cavity to the olfactory bulbs, as well as through the bloodstream (Monleau et al., 2005; Tournier et al., 2009). This passage goes via the cerebrospinal fluid along the olfactory nerve (Ibanez et al., 2014).

The next questions to consider are the cellular and subcellular localizations of uranium in the brain. Use of a laser micro-dissection technique combined with inductively coupled plasma mass spectrometry (LMD ICP–MS) has recently made it possible to show uranium in the pyramidal cell layer of the mouse hippocampus, in brain tissue stained with uranium solution at 100 mg/L (Sussulini and Becker, 2015). Rouas et al. (2010) also demonstrated in vitro that after exposure at low concentrations, uranium is localized mainly in the nucleus in neuronal (IMR-32) cell lines. At level of the proximal tubule cells of the kidneys, the uptake of uranium is mediated by a sodium-dependent phosphate

Table 1
Behavioral impairments observed after uranium exposure in experimental studies. Abbreviations: DU: depleted uranium; EU: enriched uranium.

	Route exposure			Species	Effects	References
	Ingestion	Inhalation	Injection			
Neurological signs		0.5 and 18mg DU/m ³ , 5 weeks		Cats dogs	Instability of gait, lassitude	Berke, 1949
	2mg EU/kg/day, 1.5 months			rats	increase of anxiety	Houpert, 2005
		190mg DU/m ³ , 3 weeks		rats	Increase of locomotor behaviour	Monleau, 2005
Locomotor and exploratory activities	4 or 8 mg DU/kg/day, 2 weeks, 6 months			rats	Increase of locomotor activity in males	Briner and Murray, 2005
	10, 20 and 40mg DU/kg/day, 3 months			rats	Increase of locomotor activity (10 and 20 mg/kg/day)	Belles, 2005
	4mg/kg/day of DU, during gestation and lactation		0.1 or 1mg/kg of DU, 7days	rats	Impairment of motor coordination	Abou-Donia, 2002
			Implanted pellet (4-20) of DU, 150 days	rats	No modification in locomotor activity and stereotypic movement No modification in the hearing reflex centres and in social interaction between rats	Arfsten, 2007
		190mg DU/m ³ , 3 weeks		rats	Increase rearing behaviour	Monleau, 2005
	2mg/kg/day of EU during gestation and lactation			rats	Increase exploratory activity	Houpert, 2007c
	2 mg EU/kg/day, 3, 6 and 9 months			rats	No modification of locomotor activity	Houpert, 2007b

	Route exposure		Species	Effects
	Ingestion	Inhalation		
Sleep cycle	2mg EU/kg/day, 30 or 60 days		rats	Increase the time spent in rapid eye movement sleep Lestaevel, 2005b
			rats	Shorter paradoxical sleep Lestaevel, 2005a
	2mg EU/kg/day, 1.5 months		rats	Decrease of spatial memory Houpert, 2005
Memory and learning	2 mg EU/kg/day, 3, 6 and 9 months		rats	Modification in spatial working memory at 3 and 9 months of exposure Houpert, 2007b
		190mg DU/m ³ , 3 weeks	rats	Decrease of spatial working memory Monleau, 2005
			rats	Transiently impairment of working memory Barber, 2007
	2mg/kg/day of EU during gestation and lactation		rats	Decrease in short-term memory Houpert, 2007c
	2mg/kg/day of DU from the birth until 2 months		rats	Impairment in object recognition memory. No modification of spatial working memory Lestaevel, 2013 and 2015
80mg of DU/kg/day, during neonatal period		rats	Disturbance of learning profiles Albina, 2005	
Alzheimer's disease	2mg/kg of DU, 3 months		mice	Accelerate the pathology of ApoE ^{-/-} Alzheimer's disease Lestaevel, 2014
	2 mg EU/kg/day, 3, 6 and 9 months		rats	No modification of forced swimming test Houpert, 2007b
Depression	2mg/kg/day of DU from the birth until 2 months		rats	Decrease of depressive-like behavior Lestaevel, 2015

co-transporter system (Muller et al., 2006). These co-transporters are perhaps also implicated at cerebral level. Type III of sodium-phosphate co-transporters are present in the brain and are localized in neurons, astrocytes and endothelial cells (Inden et al., 2013). Nevertheless, the main types of sodium-phosphate co-transporters in the kidneys are type II (subtype IIa and IIb) and are not expressed in brain (Hilfiker et al., 1998). These results raise the question of how uranium penetrates into brain cells and thus open new perspectives for studying the mechanisms of its toxicity.

In conclusion, the studies to underlie the mechanisms of how uranium could enter into the brain are still in progress. After inhalation, uranium is able to bypass the BBB to pass into the brain. It may also cross the BBB without alterations, but the exact mechanisms of this transfer are still unknown.

The next half describes the neurobehavioral disturbances that this passage into the brain causes.

4. Behavioral effects

Behavioral effects in humans and in various other animal species have been reported after uranium exposure. Epidemiological surveys of humans do not always make it possible to connect behavioral disorders to specific causal factor, because it is difficult to control all environmental variables. However, certain parameters can be controlled in experimental animal models. Consequently, rodents, in particular, have been used in several types of experiments to study behavioral responses.

4.1. Epidemiological studies

Behavioral disturbances have been observed in workers exposed to high concentrations of inhaled uranium. These workers showed signs of depression, apprehension, motor and language disorders (Howland, 1948). In longer-term exposures, epidemiologic studies report contradictory results about deaths from brain tumors and central nervous system cancers in nuclear workers (including miners). Mortality from cancer of the brain and central nervous system was found in excess in the post-55 French cohort of uranium miners (Rage et al., 2015; Vacquier et al., 2011), but there is no evidence of an association with cumulated exposure to radionuclides arising from uranium ore dust. Similarly, no dose-response trends were found in nuclear fuel workers between brain and central nervous system cancer mortality and cumulated lung dose equivalent used for the evaluation of internal radiation exposure (Boice et al., 2006; Carpenter et al., 1988; Checkoway et al., 1988). No increase of central nervous system cancer was observed in Gulf war veterans (Macfarlane et al., 2003; Storm et al., 2006).

Since the first Gulf war in 1991, symptoms of several veterans remained unexplained (Blanck et al., 1995). The correlation between these symptoms and the depleted uranium exposure was not clearly demonstrated. Monitoring veterans of Gulf War I has shown a reduction in cognitive abilities 7 years after exposure via wounds and penetration of uranium fragments, correlated with uranium concentrations in excreted urine (McDiarmid et al., 2002). However, further studies performed between 12 and 20 years after exposure have not confirmed these observations (McDiarmid et al., 2006, 2013). These cognitive disorders may be correlated to depleted uranium but might also be due to the psychological reactions induced by war. Stress-related health complaints are a common sequel and may add to the confusion about possible health consequences. Moreover, not all of the embedded fragments contained depleted uranium. Indeed, some fragments were primarily composed of copper, lead, iron, and zinc, which are known to cause neurological effects (Squibb et al., 2012).

Finally, Goasguen et al. (1982) reported the case of a man aged 50 years with a 6-year history of several neurological disorders, manifested by loss of balance, motor weakness, and limb atrophy. Extensive clinical examinations led to the detection of significant amounts of uranium in his feces. In the absence of any other apparent cause, these neurological deficits were attributed to uranium exposure, from a clipboard that the patient handled daily for three years. No reports about this patient and his subsequent medical monitoring appear to exist.

In conclusion, few scientific studies have directly addressed the health effects of uranium on humans. Larger studies with epidemiologically appropriate sampling and assessment tools need to be conducted on populations living around nuclear plants, for example. This paucity of human studies has led to some animal experimental studies to improve our knowledge of uranium's behavioral effects.

4.2. Experimental studies on animals exposed to uranium during adulthood

After exposure to uranium, locomotion, sleep-wake cycle and cognitive functions can be modified (Table 1). Summary of literature examining behavioral responses to uranium exposure in rodents is presented in Table 1. This overview of available data indicates the dose, the time of exposure and the species.

4.2.1. Effect on locomotion

After inhalation of uranium between 0.5 and 18 mg U/m³ during several weeks (8 h/day, 5 days/week, during until 5 weeks), neurological signs including gait instability and lassitude have been observed in dogs and cats (Berke and Rothstein, 1949). In rats exposed to 190 mg U/m³ as depleted uranium dioxide 30 min/day, 4 days/week for 3 weeks, locomotor and rearing behaviors increased significantly compared with controls on day 1 after the end of the inhalation period, but not on day 5 (Monleau et al., 2005).

Another neurobehavioral study examined the effects of depleted uranium alloy pellets (between 4 and 20 pellets) implanted in the gastrocnemius muscle of male and female adult rats (Arfsten et al., 2007). After 150 days, the authors conducted three tests from the battery of behavioral assessments of toxicity. The first test measured spontaneous locomotor activity and stereotypic movements, the second the integrity of the hearing reflex centers in the brainstem, and the third social interactions between rats. No neurobehavioral perturbations associated with depleted uranium implantation were observed in any of these tests. The authors determined, however, that further studies are needed, with more implants and longer exposure, before any definitive conclusion can be reached about the impact on rat behavior of intramuscularly implanted depleted uranium fragments.

Repeated injections of 0.1 or 1 mg/kg of uranium for 7 days impaired the motor coordination of rats (Abou-Donia et al., 2002). It is possible that uranium-induced locomotor deficits are linked to an overstimulation of the receptors modulated by excitatory amino acids. Administration of depleted uranium at 4, 8 or 10 mg/kg/day to rats via their drinking water for 2 weeks, 3 or 6 months significantly increased locomotor activity in males (Bellés et al., 2005; Briner and Murray, 2005). In the same experimental conditions, female locomotor activity was modified but not significantly (Briner and Murray, 2005). The resistance of females to uranium may be due to a difference in hormonal regulation. These results suggested that the role of the hypothalamo-pituitary axis must be considered in uranium neurotoxicity.

In summary, locomotor activities are impaired in animals exposed to uranium (Table 1). However, the exact mechanism by which uranium induces these locomotor effects remains to be elucidated. Nitric oxide, uranium replacement of calcium in the electrophysiological system, and the role of motoneurons might all play a role in these impairments.

4.2.2. Effects on the sleep-wake cycle

Three days after injection of 144 µg of depleted uranium/kg, a central effect manifested by shorter rapid eye movement (REM) sleep (–18% compared with controls) was observed in rats (Lestaavel et al., 2005b). This effect on REM sleep is explained by a decrease of the number and the mean duration of REM sleep episodes. Another study examining the effects of uranium on the sleep cycle found that more time was spent in REM sleep by rats exposed to enriched uranium at 2 mg/kg/day in mineral water for both 30 and 60 days (Lestaavel et al., 2005a). This increase in REM sleep was due to an increase in the number of REM sleep episodes rather than in episode duration. The finding that these increases in the amount of REM sleep occurred primarily during the daylight period (rats' normal sleeping period) suggests that circadian rhythms were unaffected. The neurophysiological mechanisms underlying REM sleep increases are only very partially understood. A role for the hypothalamo–pituitary axis in sleep regulation has been suggested, notably a role for glucocorticoids in the modulation of REM sleep (Born et al., 1991).

These early neurophysiological perturbations of REM sleep might subsequently induce other neurological effects. This sleep plays a fundamental role in memory processes, and its modification could induce their impairment (Jouvet, 1994).

4.2.3. Effects on cognitive functions

Barber et al. (2007) showed that intramuscular injection of 1 mg/kg of depleted uranium caused rapid, but only transient impairment of working memory in rats. A significant decrease in spatial working memory was also observed on day 6 after the end of prolonged (3-week) inhalation exposure to 190 mg depleted uranium/m³ (Monleau et al., 2005).

Rats exposed to 4% enriched uranium at 2 mg/kg/day for 1.5 months via drinking water have showed significantly decreased spatial working memory and increased anxiety (Houpert et al., 2005). In another study, a test for spatial working memory in a Y-maze was conducted after 3, 6, and 9 months of exposure to enriched uranium (Houpert et al., 2007a). The spatial working memory was decreased after 3 and 9 months of exposure. According to the investigators, these results may indicate that enriched uranium disrupts memory in spatial tasks involving the hippocampus but not in different tasks in which hippocampal functioning is less crucial. In the same experimental conditions, depleted uranium had no significant effect on memory or anxiety (Houpert et al., 2005). An imbalance of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation in the entorhinal cortex might explain the different behavioral effects induced by enriched and depleted uranium (Lestaavel et al., 2009).

Finally, the spatial working memory of Apolipoprotein E–/– mice exposed to 2 mg of depleted uranium/kg/day for 3 months decreased, suggesting that uranium exposure might accelerate the Alzheimer disease (Lestaavel et al., 2014). The behavioral modifications induced by uranium in Apolipoprotein E–/– mice might be, at least in part, linked to modifications of cholesterol in the brain (Lestaavel et al., 2014).

The most probable hypothesis to explain the cognitive effects observed is that uranium exerts a direct effect on one of the cerebral areas where it accumulates. One such cerebral area is the hippocampal region, which plays a pivotal role in spatial learning and memory (Rubaj et al., 2003; Stepanichev et al., 2003). The

hippocampus is therefore particularly relevant for considering the neurocognitive disturbances observed with uranium.

In conclusion, whatever the route of exposure, uranium is able to induce impairments in locomotor activities, sleep-wake cycle or memory in animals (Table 1). Nevertheless, it is necessary to have a dose range around mg/kg to observe these effects. It also appears that enriched uranium induced more behavioral effects than depleted uranium in the same experimental conditions.

4.3. Effects on animals exposed to uranium during development

To date, everything we know about the potential neurodevelopmental effects of uranium comes from experimental work on animals. Environmental contaminants can induce and exacerbate the neurotoxic effects when these agents are present during the critical neonatal period of brain development (Eriksson et al., 2010). The immature brain is known to be more susceptible to pollutants than the adult brain. Data about the perinatal and postnatal effects of uranium in rodents are currently sparse, and they have focused on developmental toxicity and fetal development (Domingo 2001; Paternain et al., 1989).

Parental exposure to uranium during gestation and lactation affects behaviors such as environmental responses, learning, activity, exploration, and emotionality. In one study, Briner and Abboud (2002) showed that mice exposed to depleted uranium at a dose of 4 mg/kg/day during gestation and lactation exposed mothers via drinking water showed 20% less locomotor activity at the age of 3 weeks than controls. On the contrary, after maternal exposure to enriched uranium at 2 mg/kg/day during gestation and lactation, the exploratory activity of offspring increased significantly (+72% and +88% at 5 and 9 months of age, respectively) and the spatial working memory decreased significantly (–15% at 2 months of age) (Houpert et al., 2007b). Another study suggested that learning profiles were disturbed in young rats exposed to 80 mg of depleted uranium/kg/day during the neonatal period and lactation (Albina et al., 2005). It has been suggested that greater lipid oxidation in the brain of animals exposed during development, correlated with behavioral effects, explains these changes.

Developmental and brain biochemistry changes occur rapidly during the brain growth spurt. For rats, this period is neonatal and occurs during the first 3–4 weeks after birth. Uranium exposure via maternal milk and next drinking water, from birth for 2 months impaired object recognition memory (–20%), anxiety (+37%), and depressive-like behavior (–51%) but not spatial working memory (Lestaavel et al., 2013, 2015). After 4 months of exposure, the effect on object recognition memory disappeared. These experiments on rats exposed from birth emphasized the ability of the brain to adapt to or compensate for the effects of uranium over time.

These data suggests that uranium induces more behavioral disturbances in animals exposed during cerebral development than in adult. Further studies are necessary to understand how uranium might cause these cerebral dysfunctions.

5. Conclusion

In conclusion, evidence that uranium is active in the brain includes its accumulation in cerebral areas and its behavioral effects. Nonetheless, experimental findings about these behavioral effects of uranium are sometimes contradictory, and their interpretation is complex. They can be connected to a large number of cellular and molecular causes. Although we know that neurotransmitters and oxidative stress might play a role, the exact neurobiological basis of uranium impairment of neurobehavioral functions remains unclear. Some of the mechanisms underlying these behavioral effects observed after uranium exposure will be

discussed in part 2: cellular and molecular mechanisms underlying the effects of uranium.

6. Part II: cellular and molecular mechanisms underlying the effects of uranium

As described in part 1, neurological disturbances occur in the brain after exposure to uranium, but the mechanisms by which they happen are still poorly understood. In this part 2, we describe the potential mechanisms underlying these behavioral modifications.

The effects of uranium chemical toxicity appear similar to those of other heavy metals, including cadmium, lead, and mercury (Tchounwou et al., 2012). Thus, the neurotoxicity in those metals is usually examined by inflammatory and oxidative stress responses, apoptosis and necrosis cell death or neuronal signaling and intracellular signal transduction. In addition, there might well be more than one toxic mechanism for uranium, and they could include different targets (including, for example, DNA binding, transcriptional factors that alter gene expression, and involvement of reactive oxygen species).

Most of the data in the literature come from studies that focused principally on the effects of depleted uranium on adult rodents. Study of the effects on developing animals is just beginning. Thus, the first half of this review will describe pathways investigated in experimental adult models, and the second half, some paths recently explored in developing rodents.

7. Mechanistic pathways in adult brains

7.1. Oxidative stress

The brain is particularly susceptible to oxidative damage because of its high oxidative metabolism rate, high concentrations of polyunsaturated fatty acids, low to moderate levels of antioxidant enzymes, and high iron level. Oxidative stress due to a reactive oxygen species (ROS) imbalance might therefore be a mechanism of uranium neurotoxicity. The lipid membrane is a preferential target of this ROS-induced oxidative damage, which causes lipid peroxidation. Oxidation of brain lipids after uranium exposure is well documented (Briner and Davis, 2002; Briner and Murray, 2005; Lestaavel et al., 2009; Ghosh et al., 2007; Linares et al., 2007). Correlations between lipid peroxidation in the brain and locomotor activity disturbances have been demonstrated in adult rats and mice after short- (2 weeks) and long-term (6 months) exposure to high concentrations of uranium (Briner and Davis, 2002; Briner and Murray, 2005). Increased lipid peroxidation has been observed in particular the cortex and cerebellum after 3 months of uranium contamination (10, 20, and 40 mg/kg/day; Linares et al., 2007) and in the entorhinal cortex after 9 months of uranium contamination (2 mg/kg/day; Lestaavel et al., 2009). However, lipid peroxidation was unaffected in the hippocampus (Linares et al., 2007). These results show that uranium increases lipid peroxidation in specific areas and suggests that cell membranes are damaged by oxidative stress induction

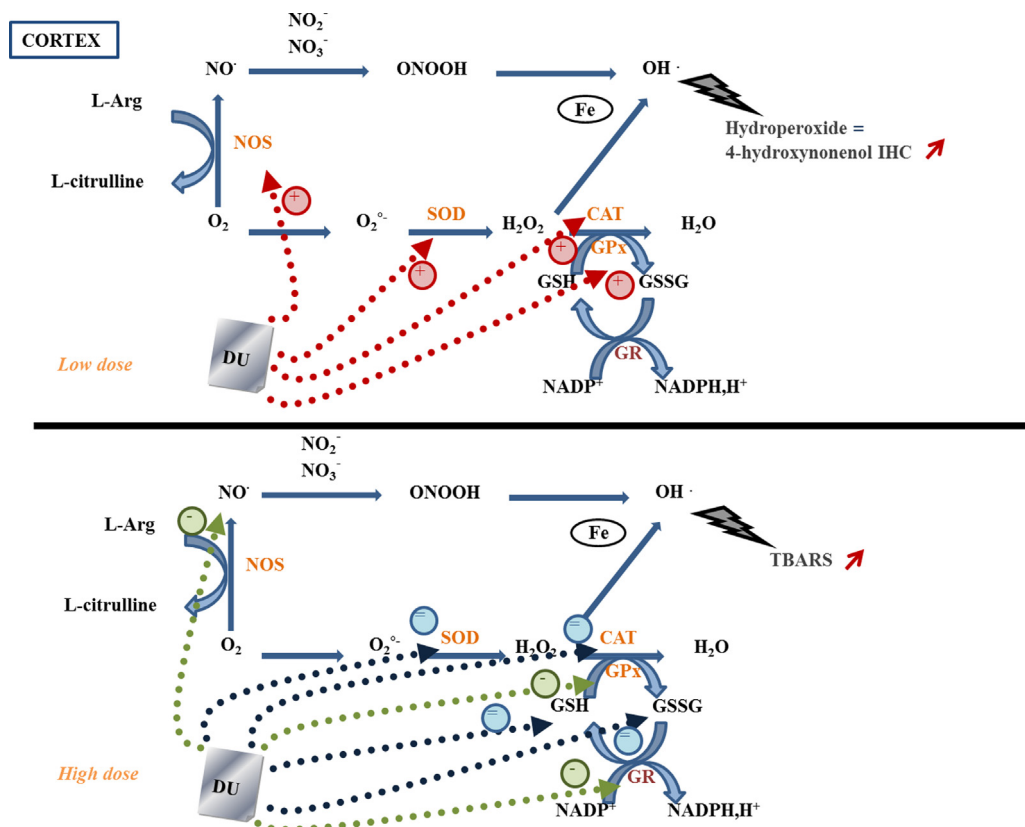


Fig. 1. Oxidative stress pathway and its response in the cortex to chronic exposure to low and high doses of uranium. At a low dose, uranium induces antioxidant responses via stimulation of the antioxidant enzyme system and the nitric oxide pathway. This mechanism counteracts oxidative stress, as confirmed by a very slight increase of lipid peroxidation, suggested by the increase of 4-hydroxynonenol staining but not by any changes in tissue hydroperoxide concentrations. Uranium at higher doses induces pro-oxidant responses by inhibiting antioxidant enzymes and the nitric oxide pathway. These alterations cause an imbalance of the oxidative system, confirmed by the increased lipid peroxidation (elevated T-BARS). From: Lestaavel (2005); Linares et al. (2007); Abou-Donia et al. (2012). Abbreviations: SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase and GR: glutathione reductase, GSH reduced glutathione, and GSSG: oxidized glutathione. Color balls indicate the stimulating (red), inhibiting (green) effects or no effect (blue) of uranium on oxidative stress pathway. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and free radical production. Uranium may thus impair ion conductance, cell membrane fluidity, and other cellular functions in the brain, as observed in other organs. For example, uranium induced-lipid peroxidation could cause mitochondrial membrane damage and significant collapse of mitochondrial membrane potential (Pourahmad et al., 2006), and also lead to cell death (Daraie et al., 2012). On the other hand, ROS production is highly in mitochondria and disruption of mitochondrial function can result in both apoptotic and necrotic cell death. As yet, no data clearly demonstrates that uranium can cause this type of damages in the brain. A recent study have suggested that in vitro depleted uranium lead to oxidative stress in isolated rat brain mitochondria and their dysfunctions (Shaki et al., 2013) which was not confirmed by another study in zebrafish model (Bourdineaud et al., 2013).

Mechanisms of anti-oxidative defense control the redox state of the cell, which is essential for normal physiological and biochemical functioning. Because modulation of their expression reflects potential oxidative stress, the principal antioxidant enzymes have been also examined, i.e., superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR). Glutathione also plays an essential role in the detoxification of ROS in the brain, and its main function is to protect against oxidative stress. Therefore, several studies have also analyzed reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione. Their results show changes in the expression, protein levels, and activity of these different antioxidant agents after chronic high-dose exposure for 3 months (Linares et al., 2007) and low-dose exposure for 9 months (Lestaavel et al., 2009)—both to depleted

uranium. At the high dose, protein levels of GR and GPx decreased in the cortex, GR decreased in the hippocampus, and GPx increased in the cerebellum. Although CAT and SOD activities did not change in the cortex, CAT activity increased in the hippocampus and the cerebellum. In parallel, GSH levels decreased and GSSG levels increased in these two brain regions (Linares et al., 2007). At the low dose, gene expression of GPx and SOD increased in the entorhinal cortex, without however any modification of their activity. In contrast, CAT activity increased without any change in its gene expression (Lestaavel et al., 2009).

The nitric oxide (NO) pathway also plays a key role in oxidative stress. NO is a free radical and a highly reactive species. At low concentrations, it performs protective or regulatory functions in cells, but has toxic effects at higher concentrations. Repeated injection of uranium at 0.1 mg/kg for 7 days increased NO levels in the cortex and brainstem, while these levels decreased in the same brain region after exposure at 1 mg/kg (Abou-Donia et al., 2002). In our laboratory, Lestaavel et al. (2009) showed an increase in inducible NO synthase expression after chronic exposure, without any modification of its activity. These results indicate that uranium exposure leads to some changes in the NO-ergic pathway that can have protective or neurotoxic effects, depending on the dose and duration of exposure. These effects also depend, however, on the uranium enrichment status, which influences the relative expression of chemical and radiological toxicity: depleted uranium appeared to induce antioxidant agents to counteract oxidative stress, whereas enriched uranium caused antioxidant activity to decrease (Lestaavel et al., 2009). This result may be linked to the

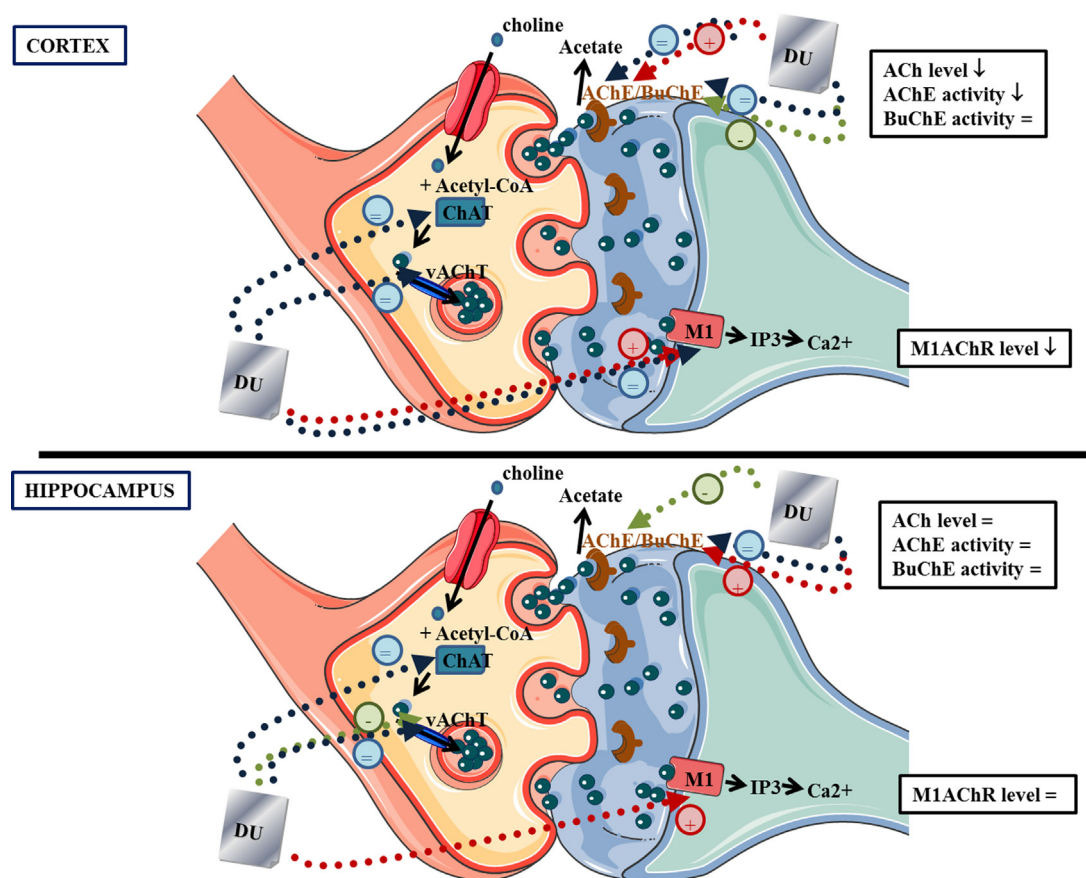


Fig. 2. Cholinergic system and its response in the cortex and the hippocampus to chronic uranium exposure. The major difference between the cortex and hippocampus is seen in the concentrations of breakdown enzymes and M1AChR. From: Bussy et al. (2006); Bensoussan et al. (2009). Abbreviations: ACh: Acetylcholine; AChE: Acetylcholine Esterase; BuChE: Butyrylcholinesterase; M1AChR: Muscarinic acetylcholine receptor Type 1; vAChT: vesicular transporter of acetylcholine; ChAT: Choline acetyltransferase. Color balls indicate the stimulating (red), inhibiting (green) effects or no effect (blue) of uranium on cholinergic system. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

neurobehavioral changes observed after exposure to enriched but not depleted uranium (Houpert et al., 2005; Houpert et al., 2005a).

In conclusion, an imbalance of pro/antioxidant systems is certainly a mechanism that may play a role in the mechanistic pathways of uranium's effects on brain functions. Nonetheless, the results described above cannot be interpreted to demonstrate that uranium has a clear and unique effect on oxidative stress. They do, however, strongly suggest that uranium induces a response that depends on exposure time and dose to adapt to particular oxidative states and that this differs further by brain region. To illustrate, Fig. 1 is a representation of the opposite response of oxidative stress pathway when it chronically exposed to low versus high doses of depleted uranium. At low dose, the uranium appeared to stimulate tissue levels of several anti-oxidative enzymes (SOD, CAT and GPx) as well as NOS, when the tissue levels of these enzymes are unchanged (NOS, SOD, CAT) or decreased (GPx, GR) after high uranium dose.

7.2. Neurotransmitter pathways

Neurotransmitters play a fundamental role in various neurophysiological processes such as neurologic behavior. Among neurotransmitters, acetylcholine has been studied most.

7.2.1. Cholinergic system and neurobehavioral functions

Acetylcholine (ACh) is an important neurotransmitter in the central nervous system and is known to be involved in higher brain functions, such as learning and memory (Drever et al., 2010; Hasselmo and Giocomo, 2006). ACh neurotransmission is also known to induce the changeover from non-rapid eye movement sleep to rapid eye movement (REM) sleep or wakefulness (Steriade, 2004). Finally, acetylcholinesterase (AChE) and acetylcholine receptor (AChR) may influence locomotor and sensorimotor performance (Gerber et al., 2001).

Cholinergic neurotransmission involves ACh synthesis and release. AChE can hydrolyze ACh on postsynaptic membranes, and AChE activity is a commonly used biomarker of neurotoxicity. Cholinergic neurons project from the brainstem to several regions, including the cortex, hippocampus, and cerebellum. These are the three principal rat brain regions studied most frequently. In the cortex, AChE activity increased after 1 month of daily intramuscular injection of depleted uranium at 1 mg/kg for 7 days, but not at 0.1 mg/kg; this increase was associated with sensorimotor alterations (Abou-Donia et al., 2002). By contrast, AChE activity decreased in the entorhinal cortex after 1.5 and 9 months of chronic exposure to 2 mg/kg/day of depleted uranium in drinking water (Bensoussan et al., 2009), while AChE activity was not modified in the frontal cortex of rats exposed to uranium in their drinking water for 6 months (Bussy et al., 2006). Although Abou-Donia et al. (2002) did not show any changes of AChE activity in the cerebellum of contaminated rats after repeated injections, this activity decreased after chronic exposure in drinking water (Bussy et al., 2006). Both time and mode of contamination differed in these two studies. Surprisingly, none of these studies observed any modification of AChE activity in the hippocampus (Bensoussan et al., 2009; Bussy et al., 2006). Various components of the cholinergic system were altered, however, such as gene expression of AChE or vesicular transporter of ACh (vAChT) or muscarinic receptor type 1 (M1AChR) in the hippocampus after subchronic and chronic exposure. These changes were not associated with modification of protein levels in the hippocampus, though, in contrast to the cortex where uranium exposure has been shown to lead to transcriptional dysregulation and translational changes. These induced a decrease in the protein levels of ACh, AChE, and M1AChR (Bensoussan et al., 2009). Fig. 2 illustrates the opposite

effects of uranium on gene expression obtained in the cortex and the hippocampus following ingestion of uranium-contaminated drinking water. A diminution of vAChT mRNA was observed in the hippocampus, with no changes in cortex. An increase in AChE mRNA and a decrease in BuChE mRNA are induced in the cortex, while AChE mRNA was decreased and BuChE mRNA increased in the hippocampus. The M1AChR mRNA was increased in both cerebral areas. In terms of enzyme activities and protein levels, Fig. 2 indicates also a global inhibitory impact in the cortex and an absence of real impact in the hippocampus. Another outstanding point is that most changes were observed in trans- and post-synaptic mechanisms, when only minor changes were noted in presynaptic pathway.

These studies indicate that the cholinergic system – but not all its components – is affected by the chemotoxicity of uranium. The effects of uranium depend on brain region, duration of exposure, and uranium concentration. Moreover the cortex appears to be more sensitive to uranium than the hippocampus. These alterations may be correlated with the behavioral changes observed after uranium exposure in REM sleep, memory, and locomotor and sensorimotor performance (see part 1).

It is now necessary to explore how uranium might play its role on the cholinergic system. This role might be direct, due to uranium accumulation in the brain (although these are not always correlated). Cholinergic neurons can modulate dopaminergic, GABAergic or glutamatergic neurotransmission (Janhunen and Ahtee, 2007) and might thus play an indirect role in other neurotransmitter systems.

7.2.2. Monoamine metabolism

Dopamine is an inhibitory neurotransmitter known to be essential in locomotor activity (Schultz, 2007). It is involved in the control of movement and posture. Dopaminergic neurons principally project from the substantia nigra to the striatum and from the ventral tegmental area to the frontal cortex and hippocampus. Serotonin is known to play a role in different physiological functions, including sleep, food intake, cognitive functions, pain, anxiety, and depression (la Fleur and Serlie, 2014; Meneses and Liy-Salmeron, 2012; Monti, 2011). Serotonergic neurons project principally from the raphe nuclei to the striatum, cortex, and hippocampus.

Subtle alterations of monoamine metabolism in specific brain regions have been shown in rats exposed to depleted uranium in their drinking water (2 mg/kg/day for 1.5, 6, and 9 months). After subchronic uranium exposure, the dopamine level in the hypothalamus decreased. In addition, the dopaminergic turnover ratio decreased in the cortex after 6 months and in the striatum after 9 months of exposure (Bussy et al., 2006). No modification of dopaminergic components was observed in the hippocampus in this study. Dopamine levels fell transiently in the striatum 3 days after an intramuscular injection of 1 mg/kg depleted uranium and returned to control levels 7 days after the injection (Barber et al., 2007); without any modification of 3,4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels and D2 receptors during this period. Like the dopaminergic system, serotonergic turnover was also disrupted in the frontal cortex after 9 months of exposure (Bussy et al., 2006). Serotonergic components were not modified in either the hippocampus or the striatum. Neither the dopaminergic nor the serotonergic metabolism was modified in any of the brain regions studied (the cortex, striatum hippocampus, and cerebellum) in rats contaminated for a month through their drinking water (2 mg/kg/day of depleted uranium) (Houpert et al., 2004). Similarly, intramuscular injection of 0.1, 0.3, or 1 mg/kg depleted uranium did not alter serotonin levels in the striatum, hippocampus, cerebellum, or cortex (Barber et al., 2007).

In summary, subtle neurochemical effects on monoaminergic systems indicate that uranium-associated modifications to the monoamine metabolism are chronic and progressive. These results suggest that the decrease in monoamine levels may result from a decrease in monoamine anabolism.

Thus, neither short- nor long-term uranium exposure appears to have a specific target in the neurotransmitter system. The data do not indicate that uranium affects the whole brain but rather that its effects are specific to each brain area and change over time.

7.3. Neurophysiological properties

The literature about the physiological properties of neurotransmission after uranium exposure is exceedingly sparse. The only brain region in which these properties have been studied is the hippocampus. Changes in electrophysiological potentials in the hippocampus have been demonstrated in animals chronically exposed to depleted uranium pellets at low (4 pellets, 120 mg), medium (10 pellets, 300 mg), and high (20 pellets, 600 mg) doses (Pellmar et al., 1999a). The ability of the synaptic potential to elicit the population spike (i.e., the E/S coupling) was impaired in the rats with 6 and 12 months of high-dose exposure and led to decreased neuronal excitability in CA1 region. These results suggest that uranium changes the efficacy of synaptic transmission

and may thus directly affect the “enter-exit” functions of the neuron. These functions are essential to guarantee both the efficacy of information transmission between neurons and synaptic plasticity, which is one of the important neurochemical foundations of learning and memory. Long-term potentiation (LTP) is a learning and memory mechanism at the cellular level that is based on lasting synaptic plasticity (Neves et al., 2008) and is induced in CA1 by high-frequency stimulation of Schaffer collaterals. Therefore, the uranium-associated changes in E/S coupling observed in CA1 may induce LTP changes.

The effect of acute uranium exposure on hippocampal GABAergic and glutamatergic neurotransmission has been examined in vitro (Vietti and Lasley, 2007): uranium was applied to hippocampal synaptosomes via superfusing buffer to estimate its inhibitory/stimulatory potency on the endogenous transmitter release component. Depolarization-evoked glutamate decreased but GABA release was not affected after uranium application. The inhibitory potency of uranium on glutamate release appeared similar to that of other divalent metal ions acting at voltage-sensitive calcium channels (Tomsig and Suszkiw, 1996). Nevertheless, uranium did not seem to show calcium-mimetic properties in this experimental protocol.

In conclusion, these data strongly suggest that uranium can alter the efficacy of synaptic transmission and glutamatergic

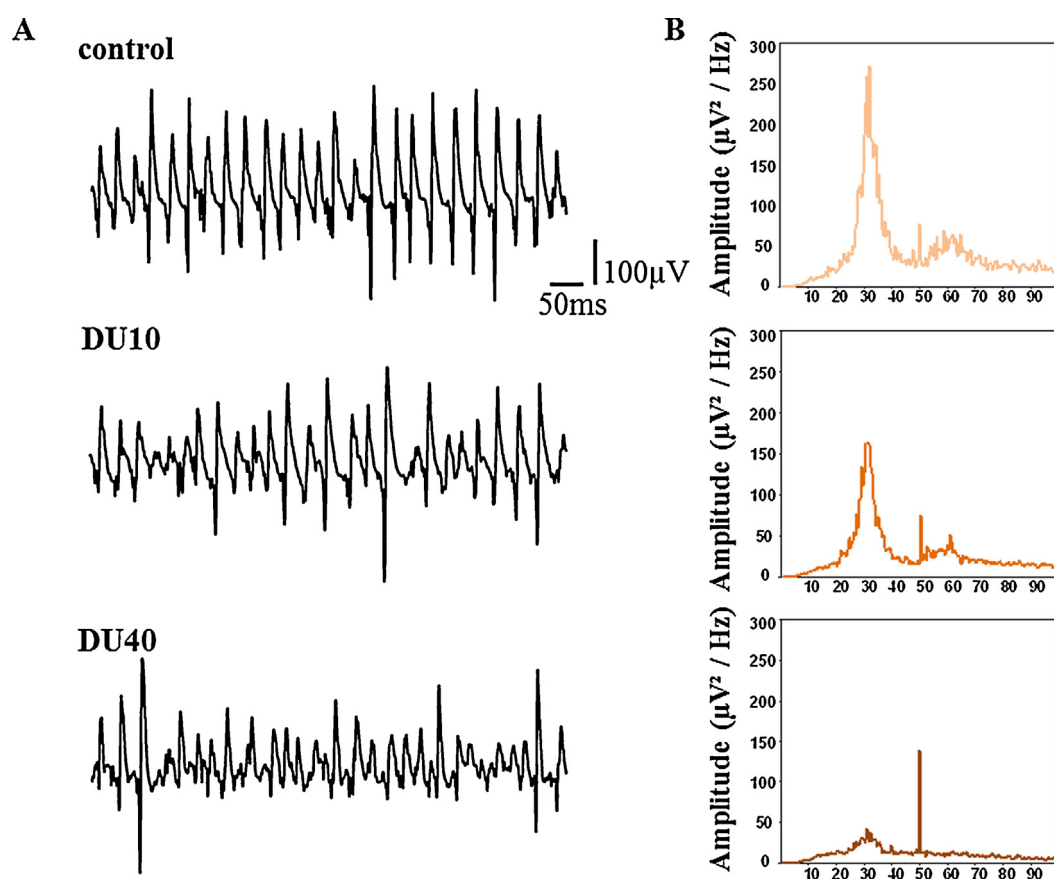


Fig. 3. Carbachol-induced β/γ oscillations in hippocampal slices of control and contaminated rats. Slices were perfused with a solution containing 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 10 D-glucose, 2CaCl₂, and 2 MgCl₂ (in mM), heated to 31–33 °C with their upper surface exposed to a humidified 5% CO₂/95% O₂ gas in an interface recording chamber. β/γ oscillations were induced by 25 μM carbachol in a solution of 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 10 D-glucose, 1.8CaCl₂, and 1.8 MgCl₂ (in mM). For the 3 groups (control, and contaminated at DU10 and DU40) animals, extracellular recordings are shown in A. The power spectra of these recordings are shown in B. We observed less powerful of these oscillations in animals contaminated at the highest dose of 2 mg/kg/day compared to control or low-dose contaminated animals (0.5 mg/kg/day). None of the slices from animals contaminated at 2 mg/kg/day of uranium displayed a power greater than 50 $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$. In contrast, 83% of slices from control rats and 83% of those from the low-dose rats had power higher than 50 $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$. The peak frequency of these oscillations did not differ between control and contaminated animals (γ : control 29.8 \pm 0.8 Hz, DU10 32.5 \pm 1.2 Hz, DU40 31.9 \pm 1.4 Hz; β : control 50.02 \pm 0.003 Hz, DU10 50.02 \pm 0.005, DU40 50.02 \pm 0.003 Hz). Abbreviations: DU10: depleted uranium 10 mg L⁻¹ (=0.5 mg kg⁻¹ day⁻¹) group, DU40: depleted uranium 40 mg L⁻¹ (=2 mg kg⁻¹ day⁻¹) group.

release in the hippocampus of rat brains. These changes lead to decreased neuronal excitability and to attenuation of the ability to support synaptic plasticity changes in synaptic function, which may contribute to cognitive deficits.

8. Mechanistic pathways in brains “under construction”

The immature brain is known to be more sensitive to pollutants than the adult brain (Grandjean and Landrigan, 2014; Rice and Barone, 2000). Little is known about neurobehavioral effects of uranium exposure (see part 1) or the mechanisms underlying these effects during the sensitive early life stages of rats. Exposure to depleted uranium during gestation and lactation induced changes in postnatal development and behavior of offspring (Houpert et al., 2007b; Sanchez et al., 2006). These results lead to the hypothesis that neurogenesis is impaired during the brain development of uranium-exposed embryos and pups (Legrand et al., 2014).

Impairments of object recognition memory, anxiety- and depressive-like behaviors were recently demonstrated in young adult rats after contamination by uranium from birth to 10 weeks at a dose of 2 mg/kg/day (Lestaavel et al., 2013, 2015). In this experimental protocol, named as the postnatal model, uranium exposure also led to an imbalance of pro/antioxidant systems in the hippocampus (Lestaavel et al., 2015) and to decreases in both ACh concentration and AChE activity in the entorhinal cortex (Lestaavel et al., 2013). As in adults, these two components of the cholinergic pathway were not modified in the hippocampus (Bensoussan et al., 2009; Bussy et al., 2006).

We are also starting to use this postnatal model to investigate synchronous network activity in the CA3 region of the hippocampus in uranium-contaminated rats. It has been known for some 25 years that rhythmic neuronal activities occur in the hippocampus during several behavioral states (Buzsaki, 1989). Among these network activities, gamma-frequency oscillation is known to be important in memory processes. High-frequency oscillations in the beta (β , 13–30 Hz) and gamma (γ , 30–70 Hz) ranges have been found in many parts of the brain and are associated with attention and perception (Arai and Natsume, 2006; Fellous and Sejnowski, 2000); they have also been linked to cognitive processing and working memory in humans (Howard et al., 2003; Tallon-Baudry et al., 1998) and animals (Fries et al., 2001; Pesaran et al., 2002). Therefore, β/γ oscillations were analyzed in the CA3 region of hippocampus slices of 2-month-old rats. The results of this study revealed impairments in the β range activities and suggest that synchronous oscillations may be disrupted by chronic uranium exposure (Dinocourt et al., 2014) (Fig. 3). Because β/γ oscillations are shown to play a role in novelty detection (Berke et al., 2008; França et al., 2014) and a decrease in β/γ oscillations has been associated with increased novelty-induced exploration and behavioral alterations during object recognition tasks (Steullet et al., 2010), our data suggest that changes in β/γ oscillations due to postnatal brain uranium exposure can impair object recognition memory. Further experiments, especially on basal neurotransmission and excitability as well as interneuron networks, are necessary to confirm these data.

In conclusion, these data demonstrate that the developing brain is, like the adult brain, affected by uranium exposure. They also indicate a lack of information about the effects of uranium on developmental processes.

8.1. Conclusion

In conclusion, uranium is present and physiologically active in the brain. Neurotoxicity induced by uranium involves: imbalance of the anti/pro-oxidant system as well as neurochemical and neurophysiological impairments. In addition, its effects appear to

be specific according to brain area, dose, and duration of exposure. From these data, further investigations can be proposed to look into the understanding of uranium's effects on cerebral functions.

9. Major conclusions and future investigations

This review demonstrates that uranium's effects on the central nervous system are relatively well documented. Major conclusions are:

- 1) It is evident that uranium is present in the brain and it is also clear that its action may be selective according to cerebral area and is not necessarily correlated with the accumulation of uranium. However, the mechanisms by which uranium enters the brain are not yet clearly elucidated.
- 2) Experimental studies indicated that uranium exposure induced changes in animals suggesting a central effect of uranium such as on locomotion, sleep-wake cycle, and cognitive functions.
- 3) Uranium acts on different targets, affecting enzyme activity as well as gene and protein expression. Nevertheless, no correlation is usually found between gene expression and enzymatic activity. Therefore, transcriptional and post-transcriptional events occurred after uranium exposure
- 4) Brain during development seems more sensitive than adult brain when exposed to depleted uranium. This observation has to be confirmed after exposure to natural as well as enriched uranium.
- 5) Assessment of the health risks from uranium exposure is principally based on its chemical rather than its radiological toxicity, and most of the studies seeking to identify the mechanisms by which it induces behavioral alterations are investigated with depleted uranium. On the other hand, behavioral alterations are most clearly visible after chronic exposure to enriched uranium.

Further investigations are therefore needed to answer some of the questions on uranium neurotoxicity research. Specifically, it is necessary to clarify how and where uranium enter into the brain (region-specific permeability of the blood brain barrier, systemic pathway, transporter) and, more importantly, to determine the correlation between uranium's effects and its accumulation.

Behavioral changes observed in animal exposed to uranium are the reflection of disturbances in neurochemical and neurophysiological properties. Uranium's effects on neurotransmitter metabolism have been well studied for acetylcholine, compared to other neurotransmitters. On the other hand, chemical neurotransmission and electrophysiological properties have not been studied in detail. Consequently, amino acid neurotransmission (for example, glutamate and GABA) as well as the properties of synaptic transmission (for example, excitability, long-term potentiation, and neuronal network oscillations) must be investigated in-depth. Further experiments are also necessary to determine if uranium plays a direct or indirect role. For example, as previous studies have shown in lungs and kidneys (Periyakaruppan et al., 2007; Yazzie et al., 2003), uranium effects on transcriptional and post-transcriptional events and DNA damage must be explored more fully, together with the involvement of reactive oxygen species.

Little is known about effects of uranium on brain during development and the subsequent impact on cerebral function in adulthood. It is well demonstrated that exposure to toxicants in early life may cause later health effects. The brain is more sensitive during its development. Impairments during the different steps of proliferation, differentiation, migration, or synaptogenesis might lead to defects in neuronal network organization and consequently lead to behavioral disorders in adulthood. Moreover, epigenetic alterations are a possible mechanistic pathway. As a heavy metal,

uranium might also alter DNA methylation (Miller et al., 2009), and this could be a part of the mechanism by which in utero or early postnatal uranium exposure affects cognitive functions in adult life. Thus, further attention and exploration are required to both the long-term consequences of uranium exposure during development and the mechanisms by which developmental processes are altered.

Finally, the question of whether or not long-term low-level uranium exposure is a hazard to human health is a new one. It appears that the release of uranium into the environment presents a threat to human health, but further studies are needed to examine exposure to uranium and its potential behavioral consequences.

Acknowledgments

We thank Audrey Legendre, Jean-Marc Bertho and François Paquet for their critical reading of the manuscript. We also thank Chrystelle Ibanez for her revision of an earlier version of the manuscript. Finally we thank Eric Samson and Estelle Rage for analysis of epidemiological studies on nuclear workers.

References

- Abou-Donia, M.B., Dechkovskaia, A.M., Goldstein, L.B., Shah, D.U., Bullman, S.L., Khan, W.A., 2002. Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 881–890.
- Albina, M.L., Bellés, M., Linares, V., Sánchez, D.J., Domingo, J.L., 2005. Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology* 215, 69–79.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2013. Toxicological Profile for Uranium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Arai, J., Natsume, K., 2006. The properties of carbachol-induced beta oscillation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Res.* 54, 95–103.
- Arfsten, D.P., Wilfong, E.R., Bekkedal, M.Y., Johnson, E.W., McInturf, S.M., Eggers, J.S., Schaeffer, D.J., Still, K.R., 2007. Evaluation of the effect of implanted depleted uranium (DU) on adult rat behavior and toxicological endpoints. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 1995–2010.
- Barber, D.S., Ehrich, M.F., Jortner, B.S., 2005. The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A* 68, 99–111.
- Barber, D.S., Hancock, S.K., McNally, A.M., Hinckley, J., Binder, E., Zimmerman, K., Ehrich, M.F., Jortner, B.S., 2007. Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology* 28, 1110–1119.
- Basset, C., Averseng, O., Ferron, P.J., Richaud, N., Hagège, A., Pible, O., Vidaud, C., 2013. Revision of the biodistribution of uranyl in serum: is fetuin-A the major protein target? *Chem. Res. Toxicol.* 26, 645–653.
- Bellés, M., Albina, M.L., Linares, V., Gómez, M., Sánchez, D.J., Domingo, J.L., 2005. Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects. *Toxicol. Lett.* 158, 176–185.
- Bensoussan, H., Grandcolas, L., Dhieux-Lestaavel, B., Delissen, O., Vacher, C.M., Dublneau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., Taouis, M., Lestaavel, P., 2009. Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* 261, 59–67.
- Berke, H., Rothstein, A., 1949. Amino aciduria in uranium poisoning; the response to different amounts of uranium given intravenously and by inhalation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 198–208.
- Berke, J.D., Hetrick, V., Breck, J., Greene, R.W., 2008. Transient 23–30 Hz oscillations in mouse hippocampus during exploration of novel environments. *Hippocampus* 18, 519–529.
- Blanck, R.R., Hiatt, J., Hyams, K.C., Kang, H., Mather, S., Murphy, F., Roswell, R., Thacker, S.B., 1995. Unexplained illnesses among desert storm veterans: a search for causes, treatment, and cooperation. *Arch. Int. Med.* 155, 262–268.
- Bleise, A., Danesi, P.R., Burkart, W., 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64, 93–112.
- Boice, J.D., Cohen, S.S., Mumma, M.T., Dupree Ellis, E., Eckerman, K.F., Leggett, R.W., Boecker, B.B., Brill, A.B., Henderson, B.E., 2006. Mortality among radiation workers at Rockwell (Atomics International), 1948–1999. *Radiat. Res.* 166, 98–115.
- Born, J., DeKloet, E.R., Wenz, H., Kern, W., Fehm, H.L., 1991. Gluco- and antiminerocorticoid effects on human sleep: a role of central corticosteroid receptors. *Am. J. Physiol.* 260, E183–E188.
- Bourdineaud, J.P., Rossignol, R., Brèthes, D., 2013. Zebrafish: a model animal for analyzing the impact of environmental pollutants on muscle and brain mitochondrial bioenergetics. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 45, 16–22.
- Briner, W., Abboud, B., 2002. Behavior of juvenile mice chronically exposed to depleted uranium. In: Khassanova, L., Collery, Ph., Maynard, I., Khassanova, Z., Etienne, J.C. (Eds.), *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 353–356.
- Briner, W., Davis, D., 2002. Lipid oxidation and behavior are correlated in depleted uranium exposed mice. In: Khassanova, L., Collery, P., Maynard, I., Khassanova, Z., Etienne, J.C. (Eds.), *Metal Ions in Biology and Medicine*, 7. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 59–63.
- Briner, W., Murray, J., 2005. Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 135–144.
- Bussy, C., Lestaavel, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., Houpert, P., 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27, 245–252.
- Buzsaki, G., 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for noisy brain states. *Neuroscience* 31, 551–570.
- Canu, I.G., Laurent, O., Pires, N., Laurier, D., Dublneau, I., 2011. Health effects of naturally radioactive water ingestion: the need for enhanced studies. *Environ. Health Perspect.* 119, 1676–1680.
- Carpenter, A.V., Flanders, W.D., Frome, E.L., Tankerley, W.G., Fry, S.A., 1988. Chemical exposures and central nervous system cancers: a case-control study among workers at two nuclear facilities. *Am. J. Ind. Med.* 13, 351–362.
- Checkoway, H., Pearce, N., Crawford-Brown, D.J., Cragle, D.L., 1988. Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *Am. J. Epidemiol.* 127, 255–266.
- Daraie, B., Pourahmad, J., Hamidi-Pour, N., Hosseini, M.J., Shaki, F., Soleimani, M., 2012. Uranyl acetate induces oxidative stress and mitochondrial membrane potential collapse in the human dermal fibroblast primary cells. *Iran. J. Pharm. Res.* 11, 495–501.
- Dinocourt C., Stefani J., Elie C., Lestaavel P., Dublneau I., Gourmelon P., 2014. Reduced carbachol-induced beta/gamma oscillations in CA3 region of hippocampus after post-natal contamination of uranium in adult rat. Meeting abstract, *Neurosciences 2014*. Washington, D.C.
- Dobson, A.W., Lack, A.K., Erikson, K.M., Aschner, M., 2006. Depleted uranium is not toxic to rat brain endothelial (RBE4) cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 110, 61–72.
- Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod. Toxicol.* 15, 603–609.
- Drever, B.D., Riedel, G., Platt, B., 2010. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav. Brain. Res.* 221, 505–514.
- Dublneau I., Souidi M., Gueguen Y., Lestaavel P., Bertho J.M., Manens L., Delissen O., Grison S., Paulard A., Monin A., Kern Y., Rouas C., Luyen J., Gourmelon P., Aigueperse J., 2014. Unexpected lack of deleterious effects of uranium on physiological systems following a chronic oral intake in adult rat. *Biomed Res Int*, 2014:181989 (online).
- Eriksson, P., Fischer, C., Stenerlöw, B., Fredriksson, A., Sundell-Bergman, S., 2010. Interaction of gamma-radiation and methyl mercury during a critical phase of neonatal brain development in mice exacerbates developmental neurobehavioural effects. *Neurotoxicology* 31, 223–229.
- Fellous, J.M., Sejnowski, T.J., 2000. Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5–2 Hz), theta (5–12 Hz), and gamma (35–70 Hz) bands. *Hippocampus* 10, 187–197.
- Fitsanakis, V.A., Erikson, K.M., Garcia, S.J., Evje, L., Syversen, T., Aschner, M., 2006. Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biol. Trace Elem. Res.* 111, 185–197.
- França, A.S., do Nascimento, G.C., Lopes-dos-Santos, V., Muratori, L., Ribeiro, S., Lobao-Soares, B., Tort, A.B., 2014. Beta2 oscillations (23–30 Hz) in the mouse hippocampus during novel object recognition. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3693–3703.
- Fries, P., Reynolds, J.H., Rorie, A.E., Desimone, R., 2001. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291, 1560–1563.
- Fukuda, S., Ikeda, M., Chiba, M., Kaneko, K., 2006. Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiat. Prot. Dosimetry* 118, 307–314.
- Gerber, D.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Huang, S.Y., Caron, M.G., Tonegawa, S., 2001. Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15312–15317.
- Ghosh, S., Kumar, A., Pandey, B.N., Mishra, K.P., 2007. Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 26, 255–261.
- Gilman, A.P., Villeneuve, D.C., Secours, V.E., Yagminas, A.P., Tracy, B.L., Quinn, J.M., Valli, V.E., Willes, R.J., Moss, M.A., 1998. Uranyl nitrate: 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Sci.* 41, 117–128.
- Goasguen, J., Lapresle, J., Ribot, C., Rocquet, G., 1982. Chronic neurological syndrome resulting from intoxication with metallic uranium. *Nouv. Presse Med.* 11, 119–121.
- Grandjean, P., Landrigan, P.J., 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 13, 330–338.
- Hasselmo, M.E., Giocomo, L.M., 2006. Cholinergic modulation of cortical function. *J. Mol. Neurosci.* 30, 133–135.
- Hémadi, M., Ha-Duong, N.T., Plantevin, S., Vidaud, C., El Hage Chahine, J.M., 2010. Can uranium follow the iron-acquisition pathway? Interaction of uranyl-loaded transferrin with receptor. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, 497–504.
- Hilfiker, H., Hattenhauer, O., Traebert, M., Forster, I., Murer, H., Biber, J., 1998. Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14564–14569.

- Houpert, P., Lestaevel, P., Amourette, C., Dhieux, B., Bussy, C., Paquet, F., 2004. Effect of U and ¹³⁷Cs chronic contamination on dopamine and serotonin metabolism in the central nervous system of the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82, 161–166.
- Houpert, P., Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Gourmelon, P., 2005. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26, 1015–1020.
- Houpert, P., Bizot, J.C., Bussy, C., Dhieux, B., Lestaevel, P., Gourmelon, P., Paquet, F., 2007a. Comparison of the effects of enriched uranium and ¹³⁷-cesium on the behaviour of rats after chronic exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 99–104.
- Houpert, P., Frelon, S., Lestaevel, P., Bussy, C., Gourmelon, P., Paquet, F., 2007b. Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology* 28, 108–113.
- Houpert, P., Frelon, S., Monleau, M., Bussy, C., Chazel, V., Paquet, F., 2007c. Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats. *Radiat. Prot. Dosimetry* 127, 86–89.
- Howard, M.W., Rizzuto, D.S., Caplan, J.B., Madsen, J.R., Lisman, J., Aschenbrenner-Scheibe, R., Schulze-Bonhage, A., Kahana, M.J., 2003. Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. *Cereb. Cortex* 13, 1369–1374.
- Howland, J.W., 1948. Comprehensive summary of the pharmacology and toxicology of uranium compounds; studies on human exposures to uranium compounds. *At. Energy Biophys. Biol. Med.* 1, 174.
- Ibanez, C., Suhard, D., Tessier, C., Delissen, O., Lestaevel, P., Dublineau, I., Gourmelon, P., 2014. Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles. *Neuropharmacol. Appl. Neurobiol.* 40, 477–488.
- Inden, M., Iriyama, M., Takagi, M., Kaneko, M., Hozumi, I., 2013. Localization of type-III sodium-dependent phosphate transporter 2 in the mouse brain. *Brain Res.* 1531, 75–83.
- Janhunen, S., Ahtee, L., 2007. Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: implications for drug development. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 287–314.
- Jouvet, M., 1994. Paradoxical sleep mechanisms. *Sleep* 17, S77–S83.
- Konietzka, R., Heinze, R., Seiwert, M., Dieter, H.H., 2014. The ex-vivo intestinal absorption rate of uranium is a two-phase function of supply. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 256–262.
- la Fleur, S.E., Serlie, M.J., 2014. The interaction between nutrition and the brain and its consequences for body weight gain and metabolism; studies in rodents and men. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 649–659.
- Legrand M., Ibanez C., Lestaevel P., Stefani J., Florès N., Eriksson P., Dinocourt C., 2014. Is neurogenesis altered after chronic internal contamination of uranium during brain development? Meeting abstract, *Neurosciences 2014*. Washington, D.C.
- Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Ménétrier, F., Flüry-Hérad, A., Roussele, C.H., Scherrmann, J.M., 2003. Study of uranium transfer across the blood–brain barrier. *Radiat. Prot. Dosimetry* 105, 243–245.
- Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarençon, D., Houpert, P., Gourmelon, P., 2005a. Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 835–840.
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., Paquet, F., 2005b. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212, 219–226.
- Lestaevel, P., Romero, E., Dhieux, B., Bensoussan, H., Berradi, H., Dublineau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., 2009. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258, 1–9.
- Lestaevel, P., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Vacher, C.M., Dublineau, I., Voisin, P., Taouis, M., 2013. Cerebral cortex and hippocampus respond differently after post-natal exposure to uranium. *J. Toxicol. Sci.* 38, 803–811.
- Lestaevel, P., Airault, F., Racine, R., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Manens, L., Aigueperse, J., Voisin, P., Souidi, M., 2014. Influence of environmental enrichment and depleted uranium on behaviour, cholesterol and acetylcholine in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* 53, 469–479.
- Lestaevel, P., Dhieux, B., Delissen, O., Benderitter, M., Aigueperse, J., 2015. Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth. *J. Toxicol. Sci.* 40, 99–107.
- Linares, V., Sanchez, D.J., Belles, M., Albina, L., Gomez, M., Domingo, J.L., 2007. Pro-oxidant effects in the brain of rats concurrently exposed to uranium and stress. *Toxicology* 236, 82–91.
- Liu, J., Lewis, G., 2014. Environmental toxicity and poor cognitive outcomes in children and adults. *J. Environ. Health* 76, 130–138.
- Macfarlane, G.J., Biggs, A.-M., Maconochie, N., Hotopf, M., Doyle, P., Lunt, M., 2003. Incidence of cancer among UK Gulf war veterans: cohort study. *Br. Med. J.* 327, 1373–1375.
- McDiarmid, M.A., Hooper, F.J., Squibb, K., McPhaul, K., Engelhardt, S.M., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., 2002. Health effects and biological monitoring results of Gulf War veterans exposed to depleted uranium. *Mil. Med.* 167, 123–124.
- McDiarmid, M.A., Engelhardt, S.M., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P.D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R.J., Gudi, R., Jacobson-Kram, D., Thorne, C.D., Squibb, K.S., 2006. Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 79, 11–21.
- McDiarmid, M.A., Gaitens, J.M., Hines, S., Breyer, R., Wong-You-Cheong, J.J., Engelhardt, S.M., Oliver, M., Gucer, P., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Hoover, D., Gaspari, A.A., Liu, J., Harberts, E., Brown, L., Centeno, J.A., Gray, P.J., Xu, H., Squibb, K.S., 2013. The Gulf War depleted uranium cohort at 20 years: bioassay results and novel approaches to fragment surveillance. *Health Phys.* 104, 347–361.
- Meneses, A., Liy-Salmeron, G., 2012. Serotonin and emotion, learning and memory. *Rev. Neurosci.* 23, 543–553.
- Miller, A.C., Stewart, M., Rivas, R., 2009. DNA methylation during depleted uranium-induced leukemia. *Biochimie* 91, 1328–1330.
- Monleau, M., Bussy, C., Lestaevel, P., Houpert, P., Paquet, F., Chazel, V., 2005. Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations. *Neurosci. Lett.* 390, 31–36.
- Monti, J.M., 2011. Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep. Med. Rev.* 15, 269–281.
- Neves, G., Cooke, S.F., Bliss, T.V., 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 65–75.
- Muller, D., Houpert, P., Cambar, J., Hengé-Napoli, M.H., 2006. Role of the sodium-dependent phosphate co-transporters and of the phosphate complexes of uranyl in the cytotoxicity of uranium in LLC-PK1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214, 166–177.
- Ortega, A., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Tomás, J.M., Paternain, J.L., 1989. Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 935–941.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A.M., Frelon, S., Gourmelon, P., 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* 90, 139–147.
- Paternain, J.L., Domingo, J.L., Ortega, A., Llobet, J.M., 1989. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 291–296.
- Pellmar, T.C., Keyser, D.O., Emery, C., Hogan, J.B., 1999a. Electrophysiological changes in hippocampal slices isolated from rats embedded with depleted uranium fragments. *Neurotoxicology* 20, 785–792.
- Pellmar, T.C., Fuciarelli, A.F., Ejniak, J.W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H.M., Landauer, M.R., 1999b. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol. Sci.* 49, 29–39.
- Periyakaruppan, A., Kumar, F., Sarkar, S., Sharma, C.S., Ramesh, G.T., 2007. Uranium induces oxidative stress in lung epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 81, 389–395.
- Pesaran, B., Pezaris, J.S., Sahani, M., Mitra, P.P., Andersen, R.A., 2002. Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat. Neurosci.* 5, 805–811.
- Poisson, C., Stefani, J., Manens, L., Delissen, O., Suhard, D., Tessier, C., Dublineau, I., Guéguen, Y., 2014. Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Arch. Toxicol.* 88, 1218–1231.
- Pourahmad, J., Ghashang, M., Ettehadi, H.A., Ghalandari, R., 2006. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity. *Environ. Toxicol.* 21, 349–354.
- Rage, E., Caër-Lorho, S., Drubay, D., Ancelet, S., Laroche, P., Laurier, D., 2015. Mortality analyses in the updated French cohort of uranium miners (1946–2007). *Int. Arch. Occupat. Environ. Health* 88, 717–730.
- Rice, D., Barone Jr., S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 3), 511–533.
- Rouas, C., Bensoussan, H., Suhard, D., Tessier, C., Grandcolas, L., Rebiere, F., Dublineau, I., Taouis, M., Pallardy, M., Lestaevel, P., Gueguen, Y., 2010. Distribution of soluble uranium in the nuclear cell compartment at subtoxic concentrations. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 1883–1889.
- Rubaj, A., Zgodziński, W., Sieklucka-Dziuba, M., 2003. The influence of adenosine A3 receptor agonist: IB-MECA, on scopolamine- and MK-801-induced memory impairment. *Behav. Brain Res.* 141, 11–17.
- Sanchez, D.J., Belles, M., Albina, M.L., Gomez, M., Linares, V., Domingo, J.L., 2006. Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology* 228, 323–332.
- Schultz, W., 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.
- Shaki, F., Hosseini, M.J., Ghazi-Khansari, M., Pourahmad, J., 2013. Depleted uranium induces disruption of energy homeostasis and oxidative stress in isolated rat brain mitochondria. *Metallomics* 5, 736–744.
- Squibb, K.S., Gaitens, J.M., Engelhardt, S., Centeno, J.A., Xu, H., Gray, P., McDiarmid, M.A., 2012. Surveillance for long-term health effects associated with depleted uranium exposure and retained embedded fragments in US veterans. *J. Occup. Environ. Med.* 54, 724–732.
- Stepanichev, M.Y., Moiseeva, Y.V., Lazareva, N.A., Onufriev, M.V., Gulyaeva, N.V., 2003. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res. Bull.* 61, 197–205.
- Steriade, M., 2004. Acetylcholine systems and rhythmic activities during the waking-sleep cycle. *Prog. Brain Res.* 145, 179–196.
- Steuillet, P., Cabungcal, J.H., Kulak, A., Kraftsik, R., Chen, Y., Dalton, T.P., Cuenod, M., Do, K.Q., 2010. Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus: impairment of parvalbumin neurons, gamma oscillations, and related behaviors. *J. Neurosci.* 30, 2547–2558.
- Storm, H.H., Jørgensen, H.O., Kejs, A.M.T., Engholm, G., 2006. Depleted uranium and cancer in Danish Balkan veterans deployed 1992–2001. *Eur. J. Cancer* 42, 2355–2358.
- Sussulini, A., Becker, J.S., 2015. Application of laser microdissection ICP-MS for high resolution elemental mapping in mouse brain tissue: a comparative study with laser ablation ICP-MS. *Talanta* 132, 579–582.
- Tallon-Baudry, C., Bertrand, O., Peronnet, F., Pernier, J., 1998. Induced gamma-band activity during the delay of a visual short-term memory task in humans. *J. Neurosci.* 18, 4244–4254.
- Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS* 101, 133–164.

- Tomsig, J.L., Suszkiw, J.B., 1996. Metal selectivity of exocytosis in alpha-toxin-permeabilized bovine chromaffin cells. *J. Neurochem.* 66, 644–650.
- Tournier, B.B., Frelon, S., Tourlonias, E., Agez, L., Delissen, O., Dublineau, I., Paquet, F., Petitot, F., 2009. Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicol. Lett.* 190, 66–73.
- Vacquier, B., Rage, E., Leuraud, K., Caër-Lorho, S., Houot, J., Acker, A., Laurier, D., 2011. The influence of multiple types of occupational exposure to radon, gamma rays and long-lived radionuclides on mortality risk in the French post-55 sub-cohort of uranium miners: 1956–1999. *Rad. Res.* 176, 796–806.
- Vietti, K.R., Lasley, S.M., 2007. Stimulus-evoked glutamate release is diminished by acute exposure to uranium in vitro. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 607–612.
- Yazzie, M., Gamble, S.L., Civitello, E.R., Stearns, D.M., 2003. Uranyl acetate causes DNA single strand breaks in vitro in the presence of ascorbate (vitamin C). *Chem. Res. Toxicol.* 16, 524–530.

Dans cette première partie, nous avons décrit les effets d'une contamination aiguë ou chronique à l'uranium sur différents organes et fonctions physiologiques majeures et plus particulièrement sur les fonctions cérébrales. Le potentiel neurotoxique de l'uranium dépend de la dose, de la voie d'administration, ainsi que de la durée d'exposition. Il est maintenant bien établi qu'après exposition, l'uranium se retrouve dans le cerveau de façon hétérogène en fonction des structures cérébrales. Par conséquent, les effets de l'uranium sur ces différentes structures cérébrales ne sont pas forcément corrélés avec l'accumulation d'uranium. Un autre paramètre de toxicité important est la période d'exposition. La majorité des études a montré que l'uranium induisait des effets centraux après exposition à l'âge adulte, comme des modifications de la locomotion, du cycle veille/sommeil et des fonctions cognitives. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux effets de l'uranium sur le cerveau au cours du développement qui semble être plus sensible à l'uranium appauvri qu'à l'âge adulte.

La formation des différentes structures du cerveau est un mécanisme complexe et dynamique pendant lequel une perturbation dans les étapes critiques de développement peut avoir des conséquences sur les fonctions cérébrales à long terme. C'est pourquoi, dans la partie suivante, nous nous sommes intéressés aux processus de formation du cerveau et plus particulièrement au processus de neurogenèse.

1.2 Le cerveau : un système dynamique au centre des fonctions comportementales

Le développement du système nerveux est assuré par un ensemble de mécanismes cellulaires et moléculaires extrêmement complexes. Le cerveau est le centre du système nerveux, il est capable d'intégrer les informations, de contrôler la motricité, de réguler les autres organes en agissant sur les muscles, les glandes et d'assurer les fonctions cognitives. Il est à la base des fonctions comportementales supérieures. Il assure ainsi la régulation de toutes les fonctions vitales.

Chez l'Homme, le temps de gestation est d'environ 40 semaines alors que chez le rat il est de 21 à 22 jours. À la naissance, toutes les structures du cerveau humain sont formées alors que chez le rat, des structures comme l'hippocampe continuent de se développer pendant les premières semaines postnatales. Les trois premières semaines de vie postnatale chez le rat sont comparables à la fin de la période prénatale chez l'homme. Cependant, le cerveau du rat atteint une apparence adulte 6 semaines après fécondation alors que le cerveau humain devient adulte en 7 fois plus de temps.

Dans cette partie, nous allons décrire les étapes de formation du cerveau et plus particulièrement du cortex et de l'hippocampe chez le rat, qui est notre modèle d'étude.

1.2.1 Le cerveau en développement

1.2.1.1 Morphogenèse du système nerveux central

La formation du système nerveux central se déroule durant les premiers stades de gestation, c'est-à-dire à partir du 8^e jour embryonnaire.

Au stade de gastrulation, l'embryon est constitué de trois couches superposées : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. C'est l'ectoderme, couche la plus périphérique, qui donne naissance au système nerveux. Durant le développement, l'épaississement de l'ectoderme donne naissance à la plaque neurale. La neurulation permet ensuite la formation du tube neural et de la crête neurale (figure 4).

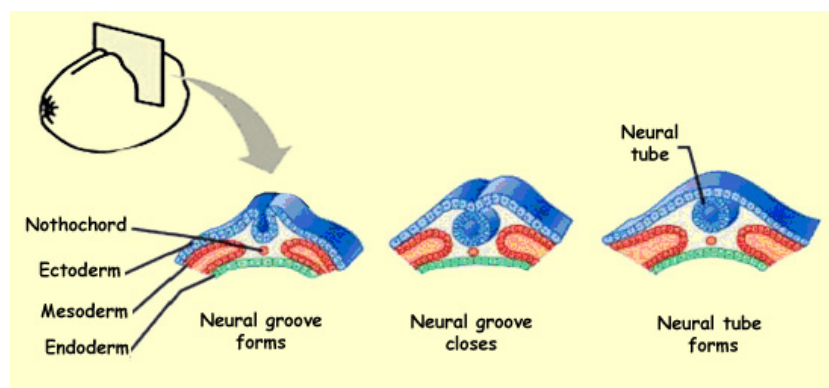


FIGURE 4 – Étapes de formation du tube neural (source : <http://lecerveau.mcgill.ca>)

Le tube neural va donner naissance au système nerveux central (cerveau et moelle épinière) et les crêtes neurales vont donner naissance au système nerveux périphérique (nerfs, ganglions, système sympathique et parasympathique). La plaque neurale se referme en tube neural où les cellules se multiplient dans la zone germinale.

La multiplication des cellules neuroépithéliales entraîne la dilatation de l'extrémité antérieure du tube neural en vésicule cérébrale primitive. Cette vésicule se divise en trois vésicules appelées prosencéphale (cerveau antérieur), mésencéphale (cerveau moyen) et rhombencéphale (cerveau postérieur) qui vont ensuite se diviser pour former cinq vésicules. Le prosencéphale se divise en télencéphale comprenant deux expansions moyennes qui vont former les futurs hémisphères cérébraux et en diencephale. Le rhombencéphale se divise en métencéphale qui formera la protubérance annulaire et le cervelet et en myélocéphale, qui est le futur bulbe rachidien (figure 5).

Au stade E11,5, la paroi des vésicules cérébrales, peu épaisse et avasculaire, est formée d'un épithélium pseudo stratifié simple composé d'une zone ventriculaire contenant les corps cellulaires des cellules neuroépithéliales et d'une zone marginale composée par les prolongements périphé-

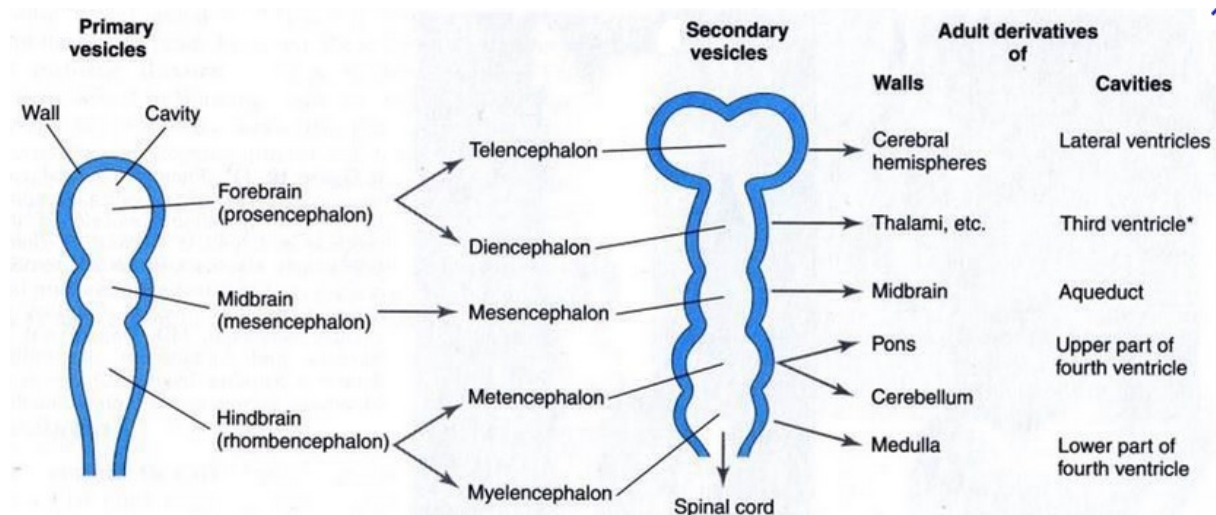


FIGURE 5 – Formation des cinq vésicules constituant le système nerveux central (source : [www . snv . jussieu . fr](http://www.snv.jussieu.fr))

riques. La formation des différentes structures du cerveau continue ensuite par la prolifération de ces cellules au niveau des zones sous ventriculaire et marginale. La prolifération des cellules dans la zone ventriculaire entraîne la dilatation de la paroi qui contribue à la naissance des zones sous ventriculaire et intermédiaire. Cette prolifération intensive se poursuit par les processus de migration et de différenciation en cellules gliales ou en neurones jusqu'à leur emplacement définitif. Ce sont les processus de gliogenèse et de neurogenèse. Ces deux processus se déroulent à partir d'une population de cellules souches multipotentes s'engageant vers la voie de différenciation gliale ou neuronale. Par la suite, nous allons nous intéresser plus particulièrement au processus de neurogenèse au niveau du télencéphale, car il donne naissance au cortex et à l'hippocampe qui sont deux structures impliquées dans les fonctions cognitives.

1.2.1.2 La neurogenèse télencéphalique

Le télencéphale est constitué de différents éléments : le pallium et le subpallium. La région dorsale du pallium donne naissance au néocortex, la région médiane à l'hippocampe et la région latérale au cortex limbique. Les neurones issus de ces régions sont majoritairement excitateurs de type glutamatergique. Le subpallium donne naissance aux éminences ganglionnaires latérales (EGL), médianes (EGM) et caudales (EGC) qui donnent naissance aux interneurons de type GABAergique (acide gamma-aminobutyrique) ayant une activité inhibitrice. L'EGL produit les interneurons du striatum et du pallidum, tandis que l'EGM et l'EGC produisent les interneurons corticaux et hippocampiques (figure 6).

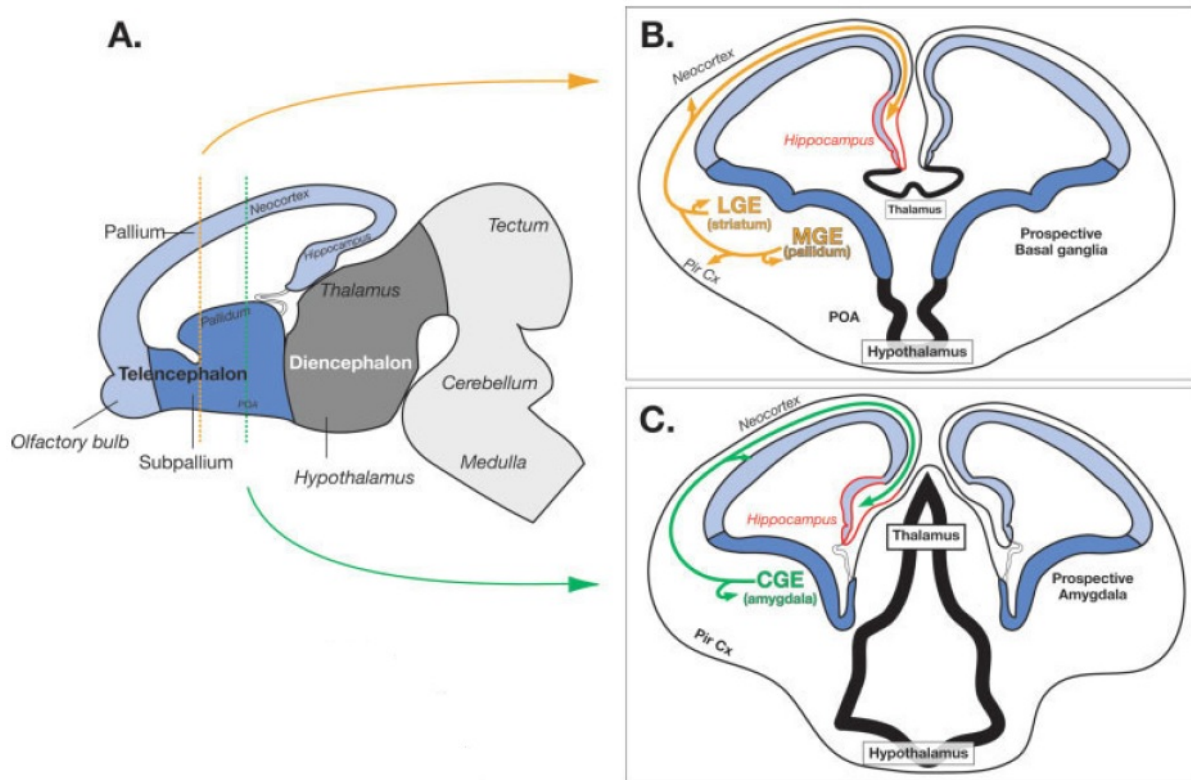


FIGURE 6 – Formation du télencéphale (source : Danglot *et al.* 2006)

A : Section sagittale d'un cerveau de rat à E15. Le télencéphale (bleu) donne naissance au néocortex, à l'hippocampe et au cortex limbique.

B-C : Sections coronales d'un cerveau de rat en développement. L'éminence ganglionnaire médiale (MGE) donne naissance au pallium, l'éminence ganglionnaire latérale (LGE) au striatum et l'éminence ganglionnaire caudale (CGE) à l'amygdale. Les interneurons hippocampiques proviennent de la MGE et de la CGE alors que la LGE donne naissance aux interneurons du bulbe olfactifs, du cortex et du noyau accumbens.

1.2.1.2.1 Les cellules souches neurales

La neurogenèse implique la participation de plusieurs types cellulaires. Pendant très longtemps, les neurones et les cellules gliales étaient considérés comme provenant de deux pools de précurseurs distincts. Ce n'est que récemment que l'origine gliale des cellules souches neurales a été démontrée. Les neurones ont plusieurs origines cellulaires : les cellules souches neurales, les progéniteurs intermédiaires et les cellules gliales radiales (Kriegsten et Alvarez-Buylla 2009).

Les neurones naissent à partir des zones ventriculaire et sous ventriculaire du neuroépithélium. Le neuroépithélium, qui apparaît à partir du 10^e jour embryonnaire, est formé d'une couche de cellules neuroépithéliales pseudostratifiées, due à la migration apicale/basale des cellules en division pendant le cycle cellulaire. Pendant la neurogenèse, le neuroépithélium se divise en plusieurs couches de cellules, dont la zone ventriculaire bordant le ventricule latéral et contenant les cellules souches neurales.

Les neurones ou les cellules gliales ne proviennent pas forcément directement des cellules souches neurales. En effet, ils peuvent être générés par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs étapes d'amplification *via* des progéniteurs intermédiaires.

Le neuroépithélium donne aussi naissance aux cellules gliales radiales ayant des propriétés d'astrocytes. Ces cellules gliales radiales ont longtemps été considérées comme ayant un rôle structural au cours du développement du cerveau. En effet, ces cellules établissent des contacts étroits avec les vaisseaux sanguins et sont en liens avec les jonctions communicantes. Récemment, ces cellules ont été décrites comme étant aussi des progéniteurs neuronaux majeurs. Par conséquent, la plupart des neurones du système nerveux central dérivent directement des cellules gliales radiales ou indirectement *via* les progéniteurs intermédiaires. Les cellules gliales radiales ont donc un double rôle, en permettant la maintenance d'une polarité apical/basal le long du neuroépithélium grâce aux filaments intermédiaires leur servant de guide de migration et en étant à la l'origine des neurones (Anthony *et al.* 2004)

Les cellules provenant du neuroépithélium deviennent donc soit post-mitotiques et se différencient en neurones, soit deviennent des précurseurs des cellules gliales ou forment la matrice germinale secondaire. La matrice germinale secondaire formera la zone sous ventriculaire, adjacente à la zone ventriculaire. La zone sous ventriculaire contient donc les progéniteurs intermédiaires issus de la division des cellules souches neurales de la zone ventriculaire.

La neurogenèse est un processus dynamique se déroulant en plusieurs étapes, incluant les phases de prolifération et de mort cellulaire, de migration et de différenciation neuronale et enfin d'intégration synaptique. Ces différentes étapes vont être détaillées par la suite.

1.2.1.2.2 Développement du cortex

Le cortex cérébral est la structure la plus importante du télencéphale et se divise en archicortex, paléocortex et néocortex. Dans cette partie, nous allons nous intéresser plus particulièrement au néocortex qui est impliqué dans les fonctions cognitives supérieures.

La mise en place du néocortex est complexe et met en jeu la production d'une centaine de types cellulaires distincts. Les neurones du néocortex prennent naissance à partir du neuroépithélium et sont organisés en circuits fonctionnels qui forment des couches et des régions aboutissant à la naissance des aires corticales qui ont de nombreuses fonctions.

1.2.1.2.2.1 Structure du néocortex

Chez les mammifères, les neurones du néocortex sont organisés en plus de quarante aires et en six couches de cellules numérotées à partir de la surface du cortex qui sont caractérisées par la morphologie neuronale, les projections axonales et leurs fonctions (Job et Tan 2003) (figure 7).

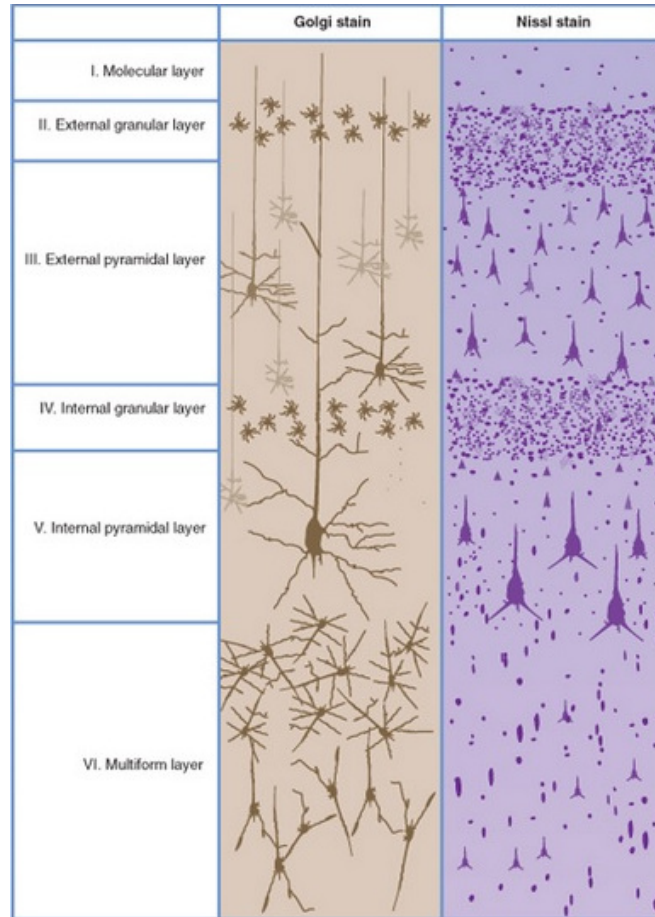


FIGURE 7 – Les différentes couches constituant le néocortex (source : <http://accès.ens-lyon.fr>)

- La couche moléculaire (couche I) contient les neurones Cajal-Retzius.
- La couche granulaire externe (couche II) contient les neurones granulaires.
- La couche pyramidale externe (couche III) est constituée de cellules pyramidales.
- La couche granulaire interne (couche IV) contient des neurones étoilés et pyramidaux.
- La couche pyramidale interne (couche V). C'est également une couche envoyant des connexions efférentes mais qui sortent du cortex. C'est, par exemple, de cette couche que partent les neurones qui innervent les motoneurones.
- La couche polymorphe (couche VI), la couche la plus interne à l'état adulte. Elle envoie des prolongements axonaux en direction du thalamus permettant une rétroaction sur les entrées du cortex cérébral.

1.2.1.2.2 Les différents types de neurones

Les neurones du néocortex sont classés selon leur profil neurochimique, leur morphologie et leur réponse électrophysiologique.

On distingue les neurones pyramidaux excitateurs glutamatergiques qui représentent 80 % des neurones du néocortex et sont composés de nombreux sous-types, chacun étant caractérisé par leur position, leur morphologie et leur connectivité. Ils sont à la base de la communication rapide à courte et longue distance dans le cortex cérébral (Molyneaux *et al.* 2007).

Les interneurones GABAergiques représentent 20 % des neurones du cortex. Ils ont une fonction inhibitrice essentielle dans la mise en place de circuits neuronaux fonctionnels. Contrairement aux neurones excitateurs, ils ont une origine extrinsèque et sont principalement générés au niveau des éminences ganglionnaires et arrivent au cortex par migration tangentielle.

1.2.1.2.3 Étapes de formation du néocortex

La formation et l'organisation des couches du néocortex se déroulent en 3 phases majeures. Les premières cellules du néocortex à être formées, pendant la première phase, sont des neurones pré-curseurs appelés Cajal-Retzius ainsi que les neurones de la sous-plaque (Couche VII). Les cellules Cajal-Retzius constituent un type transitoire de neurones facilitant les migrations neuronales et permettant l'attachement des prolongements des cellules gliales radiales à la surface basale du neuroépithélium. Elles sécrètent également de la reelin, indispensable au maintien des cellules gliales radiales (Zhao *et al.* 2004). Ces cellules Cajal-Retzius, ainsi que les neurones de la sous plaque corticale, sont générées à partir du 11^e jour embryonnaire, à la périphérie du pallium, et migrent tangentiellement à la surface du cortex (les cellules en superficie sont les premières à être générées et les cellules en profondeur sont les nouvelles cellules) (Arcangelo *et al.* 1995). Le pic de formation se situe à E14 pour les cellules Cajal-Retzius et entre E14 et E15 pour les neurones de la sous-plaque (Bayer et Altman 1990). Les neurones des couches VI-II sont générés pendant la deuxième et la troisième phases et se positionnent selon un gradient radial (les cellules en profondeur sont les premières à être générées et les cellules en superficie sont les nouvelles cellules), ce gradient étant le plus répandu dans le cerveau. Les neurones des couches VI-V sont générés de E15 à E17 (phase 2) et les neurones des couches IV-II de E17 à E20 (phase 3) (Bayer et Altman 1990) (figure 8).

1.2.1.2.4 Processus de prolifération cellulaire

La première couche du cortex à être formée est la pré-plaque corticale. La formation des neurones corticaux débute dès E11 avec une majorité des neurones générés entre E14 et E20 (Bayer et Altman 1990). Aux stades précoces de développement, les cellules neuroépithéliales provenant de la zone

NEURO-GENETIC TIMETABLES IN EACH STRUCTURE	ESTIMATED TIME OF DEVELOPMENT IN MAN (IN WEEKS)										
	3.5-4.0	4.1-5.2	5.3-5.7	5.8-6.6	6.7-7.0	7.1-7.4	7.5-7.9	8.0-9.9	10.0-11.9	12.0-14.9	15.0-16.9
	EXPERIMENTALLY DETERMINED DATA IN RATS (IN DAYS)										
	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21
NEOCORTEX AND LIMBIC CORTEX:											
CAJAL-RETZIUS NEURONS (I)				■	■	■	■				
LAYERS IV-II							■	■	■	■	
LAYER V					■	■	■	■			
LAYER VI				■	■	■	■				
SUBPLATE NEURONS (VII)				■	■	■	■				

FIGURE 8 – Stades de formation des différentes structures du cortex (source : [Bayer et al. 1993](#))

Le néocortex du rat et de l'homme est constitué de cinq couches de cellules. Chez le rat, les couches superficielles (II-IV) sont plus petites mais les couches VI et V sont identiques. Les étapes de développement du néocortex du rat sont comparables à celui de l'Homme. La fin du développement du néocortex se situe à E21 chez le rat et à 16 semaines de grossesse chez l'Homme.

ventriculaire du neuroépithélium prolifère de façon symétrique, donnant deux cellules neuroépithéliales capables elles-mêmes de proliférer. Le nombre de cellules augmente donc de manière exponentielle permettant d'accroître rapidement la surface du cortex ([Noctor et al. 2004](#)). Les premiers neurones sont générés et, à partir de E12, les cellules neuroépithéliales commencent à acquérir des propriétés gliales et se transforment progressivement en cellules gliales radiales. Les cellules neuroépithéliales subissent alors des changements morphologiques, accompagnés de l'acquisition de microtubules et de filaments intermédiaires. Elles commencent aussi à exprimer les marqueurs astrogliaux comme le GLAST (transporteur spécifique du glutamate) et des protéines de filaments intermédiaires comme la nestine ou la vimentine. Les cellules gliales radiales passent alors à un mode de division asymétrique où chaque division produit un progéniteur qui reste dans le neuroépithélium, et un neuroblaste qui migre radialement vers la surface du télencéphale, formant l'ébauche corticale. Cette première migration s'effectue sans guide gliale et les neurones générés forment la pré-plaque corticale ([Noctor et al. 2004](#)). Ces différents types de neurones constituent une population hétérogène de cellules qui sont les premières à se différencier et à acquérir des propriétés neuronales (figure 9).

La pré-plaque se comporte comme une ébauche de cortex, facilitant les migrations cellulaires et l'établissement des projections axonales. Suite à sa mise en place, commence une période de neurogenèse active produisant les neurones de la plaque corticale et les interneurons.

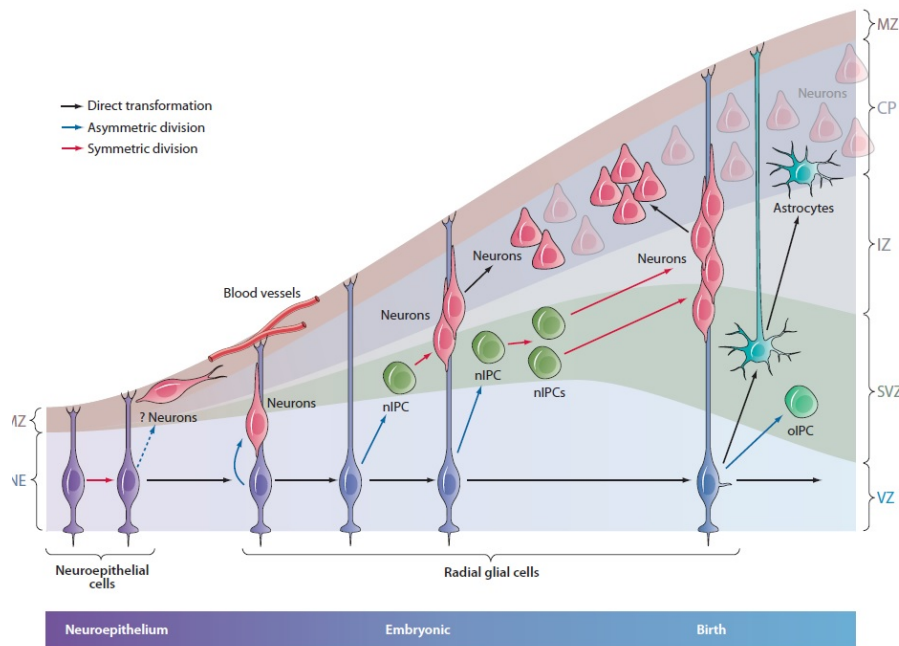


FIGURE 9 – Processus de neurogenèse au niveau du cortex au cours du développement (source : [Kriegsten et Alvarez-Buylla 2009](#))

Au stade précoce de développement, la division symétrique des cellules neuroépi-théliales permet d'accroître rapidement la surface du neuroépithélium. À ce stade, quelques cellules neuroépi-théliales génèrent des neurones précoces. Au cours du dé-veloppement, ces cellules neuroépi-théliales s'allongent et se convertissent en cellules gliales radiales qui subissent des divisions asymétriques afin de générer des neurones directement ou indirectement *via* les cellules progénitrices intermédiaires (nIPCs). Les cellules gliales radiales ont une polarité apicale-basale et sont en contact avec le ven-tricule (apical) et les méninges et les vaisseaux sanguins (basal). Les oligodendrocytes (oIPCs) proviennent également des cellules gliales radiales *via* les cellules progé-nitrices intermédiaires. À la fin du développement embryonnaire, la majorité des cellules gliales radiales se détache du côté apical et se transforme en astrocytes, mais la pro-duction d'oligodendrocytes continue. Quelques cellules gliales radiales maintiennent leur contact apical et gardent leurs propriétés de cellules souches après la nais-sance. Ces cellules continuent de générer des neurones et des oligodendrocytes par l'inter-médiaire des progéniteurs nIPCs et oIPCS.

Les cellules gliales radiales donnent naissance aux neurones directement, ou indirectement *via* les progéniteurs intermédiaires qu'elles ont générés dans la zone sous ventriculaire ([Miyata et al. 2004](#), [Noctor et al. 2004](#)). Elles génèrent les neuroblastes tout en leur servant de guide pour migrer et se positionner en couche dans l'épaisseur du cortex. La zone sous ventriculaire devient un site ma-jeur de neurogenèse. Les progéniteurs intermédiaires ont un mode de division symétrique donnant naissance soit à deux neurones, soit à deux autres progéniteurs intermédiaires ([Noctor et al. 2004](#)). Ces progéniteurs sont différents des cellules souches et des cellules gliales radiales et expriment des gènes différents ([Tarabykin et al. 2001](#), [Nieto et al. 2004](#)).

Au cours du développement, nous pouvons donc distinguer deux zones prolifératives : la zone ventriculaire et de la zone sous ventriculaire. La zone ventriculaire contient les cellules souches neurales et la zone sous ventriculaire est constituée des progéniteurs neuronaux intermédiaires.

Pendant le cycle cellulaire, les noyaux des cellules souches en prolifération au niveau de la zone ventriculaire suivent des mouvements intercinétiques, se déplaçant sur l'épaisseur de la zone ventriculaire en fonction des différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules neuroépithéliales, les cellules gliales radiales et les progéniteurs possèdent une polarité apicale/basale au sein du neuroépithélium. La migration intercinétique des noyaux des cellules souches s'effectue sur toute la longueur de l'axe apical/basal des cellules. Ainsi, pendant la phase G1, le noyau des cellules migre jusqu'à la surface basale de la zone ventriculaire. Puis, il entreprend sa division durant la phase S. Il migre à nouveau vers la surface apicale de la zone ventriculaire pendant la phase G2 pour entrer en mitose (figure 10a). Le noyau des cellules gliales radiales effectue une migration similaire mais seulement jusqu'à la surface basale de la zone ventriculaire (figure 10b). La prolifération des progéniteurs s'effectue sans translocation intercinétique du noyau. Le noyau des progéniteurs migre de la surface apicale des zones ventriculaire ou sous ventriculaire où il entreprend sa division durant la phase S ainsi que la phase G2 et la mitose (figure 10c). Pendant la phase de migration jusqu'à la surface basale, les progéniteurs rétractent leur prolongement vers la surface basale ([Takahashi et al. 1996](#), [Miyama et al. 1997](#), [Haydar et al. 2000](#), [Brazel et al. 2003](#), [Gotz et Huttner 2005](#), [Kriegsten et Alvarez-Buylla 2009](#)).

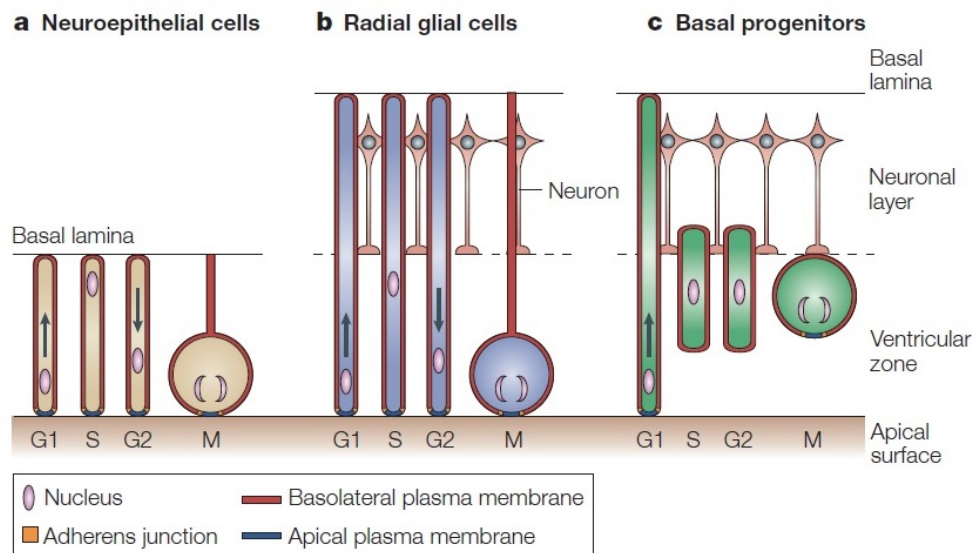


FIGURE 10 – Polarité des cellules et migration intercinétique nucléaire (source : [Gotz et Huttner 2005](#))

La durée du cycle cellulaire augmente au cours du développement. Au niveau de la formation du tube neural, la durée du cycle cellulaire est de huit heures ([Hoshino et al. 1973](#)). La transition du

mode de division symétrique (mode prolifératif) au mode de division asymétrique (mode neurogénique) s'accompagne d'une augmentation de la durée du cycle cellulaire (Takahashi *et al.* 1995). Au stade embryonnaire E11, la durée du cycle est de onze heures (Atlas et Bond 1965) et de quinze heures au stade E13 (Hoshino *et al.* 1973). La durée du cycle cellulaire augmente de onze à dix-neuf heures entre les stades E12 et E19 (Waechter et Jaensch 1972). Cette augmentation dans la durée du cycle cellulaire est principalement due à une augmentation de la durée de la phase G1, les autres phases comme la phase S ou G2 ne varient pas beaucoup en fonction du temps. Ainsi, le potentiel prolifératif est augmenté par une diminution de la durée du cycle cellulaire alors qu'un potentiel de différenciation est médié par une augmentation de la durée du cycle cellulaire (Calegari et Huttnner 2003, Lange *et al.* 2009, Pilaz *et al.* 2009, Artegiani *et al.* 2011, Beukelaers *et al.* 2011a).

1.2.1.2.2.5 Migration radiaire et tangentielle

La migration neuronale permet la mise en place des différentes couches du néocortex. Les cellules post-mitotiques issues de la zone ventriculaire migrent vers la surface du cortex suivant un mode de migration radial. Les premiers neurones générés se positionnent dans la couche profonde et les nouveaux neurones dans les couches superficielles (figure 11).

Les nouveaux neurones produits s'intercalent au sein de la pré-plaque corticale donnant naissance à la zone marginale et à la sous-plaque corticale. Les neurones générés dans la zone ventriculaire migrent radialement vers la zone sous ventriculaire. Ils restent dans la zone sous ventriculaire et la zone intermédiaire pendant vingt-quatre heures puis deviennent multipolaires. À ce stade, les neurones ne sont pas encore liés aux cellules gliales radiales et peuvent donc migrer de façon tangentielle au sein de la zone sous ventriculaire. Ensuite, la plupart des neurones subissent une translocation jusqu'au ventricule puis migrent vers la surface du neuroépithélium cortical en subissant des changements morphologiques : ils deviennent bipolaires. Certains neurones migrent vers la surface du neuroépithélium sans le mouvement rétrograde vers le ventricule (Kriegsten *et al.* 2004). Au terme du développement, les neurones de la zone marginale deviendront la couche I du cortex cérébral, très pauvre en corps cellulaires, tandis que certains neurones survivants de la sous-plaque intégreront la partie ventriculaire de la couche la plus basale. E21 est le dernier jour de la neurogenèse corticale et quelques neurones de la couche II sont encore générés (Tan et Shi 2013).

Pendant la migration des neurones vers leur emplacement définitif, ceux-ci se différencient en neurones matures. Lorsqu'ils ont rejoint leur emplacement définitif, les neurones émettent des axones vers leur cible spécifique pour établir des contacts synaptiques, permettant la construction des réseaux neuronaux.

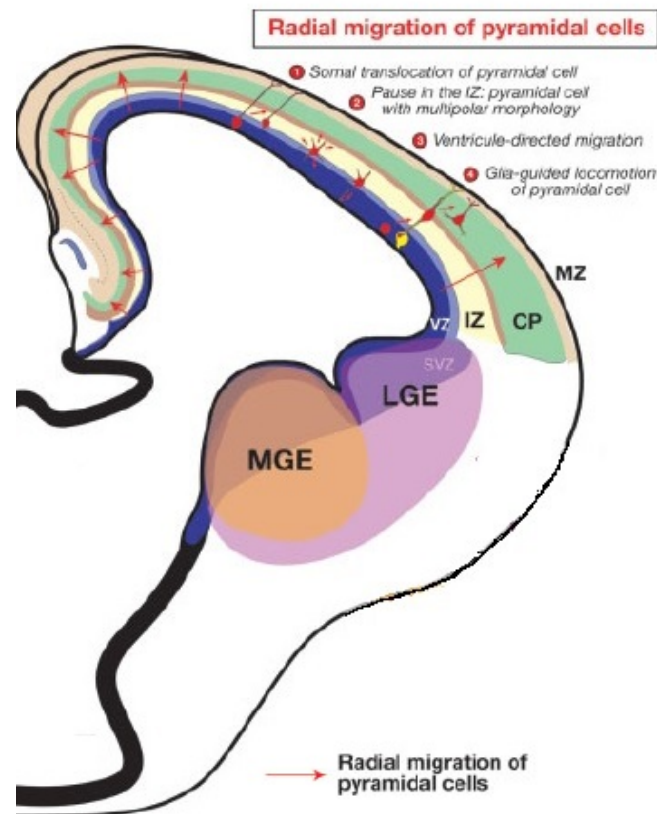


FIGURE 11 – Mode de migration des cellules pyramidales dans le cortex et l'hippocampe (source : Danglot *et al.* 2006)

Les cellules pyramidales provenant du neuroépithélium migrent de façon radiale jusqu'à atteindre la surface du cortex ou de l'hippocampe. Quatre modes de migration sont décrits : la translocation des corps cellulaires pendant les phases précoces de la corticogénèse, la migration *via* les cellules gliales radiales, la migration multipolaire dans les zones intermédiaire et sous ventriculaire et la migration directe du ventriculaire. MGE : medial ganglionic eminence, LGE : lateral ganglionic eminence, VZ : ventricular zone, IZ : intermediate zone, CP : cortical plate, MZ : marginal zone.

Au stade postnatal, la majorité des cellules gliales radiales perdent leur attachement ventriculaire et migrent jusqu'à la surface du cortex par translocation et vont se différencier en astrocytes. Cette transformation des cellules gliales radiales participe à l'augmentation importante du nombre d'astrocytes (Noctor *et al.* 2008). Les oligodendrocytes commencent également à se différencier en étendant leur prolongement et en exprimant la myéline, qui forme des membranes autour des axones, favorisant la conduction nerveuse. Les oligodendrocytes contribuent aussi à la maintenance de l'intégrité axonale ainsi qu'à la survie neuronale. Cette relation étroite entre les neurones et les oligodendrocytes participe activement à la signalisation neuronale (Lin et Bergles 2004). Ces processus,

se déroulant majoritairement pendant le développement postnatal, jouent un rôle critique dans la maturation fonctionnelle des circuits neuronaux en développement.

1.2.1.2.2.6 Voies de signalisation neuronales

Les mécanismes induisant la prolifération, la migration et la différenciation des progéniteurs en neurones ou en cellules gliales pendant le développement ne sont pas encore bien élucidés (Desai McConnell 2000). Le processus de différenciation neuronale est régulé par un ensemble de signaux extrinsèques et de facteurs génétiques intrinsèques extrêmement complexes puisqu'un signal peut avoir différents effets en fonction du stade de développement. De plus, les voies de signalisation interagissent entre elles et régulent la différenciation cellulaire en modulant l'expression et l'activité des facteurs de transcription dans les cellules souches neurales. La différenciation en cellules gliales radiales ou en neurones implique une synergie ou une inhibition entre les facteurs de transcription et la régulation de l'expression de ces facteurs et leurs activités. De nombreuses voies de signalisation et facteurs de croissance sont impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches neurales, incluant la prolifération et la maintenance dans un état indifférencié.

Parmi ces acteurs de la signalisation cellulaire, les facteurs de transcription proneuraux appartenant à la famille bHLH (basic helix-loop-helix) jouent un rôle critique dans le développement et la différenciation des neurones. Les membres de la famille bHLH sont impliqués dans tous les stades et processus de développement des neurones. En effet, certains sont exprimés dans les précurseurs précoces en cours de prolifération et d'autres sont exprimés dans les neurones en cours de différenciation (Lewis 1996).

Deux types de gènes bHLH sont connus : les inhibiteurs qui comportent les gènes Hes (Enhancer of split) et les activateurs qui incluent les gènes Mash1, Math et les neurogénines 1 et 2. Les gènes Hes favorisent la gliogenèse et sont exprimés par les cellules souches neurales et ont pour cibles les gènes activateurs bHLH en inhibant l'expression et l'activité de Mash1 (Ishibashi *et al.* 1995, Chen *et al.* 1997). L'expression des gènes Hes1 et Hes5 est régulée par la voie de signalisation Notch qui a un effet activateur de la voie Hes. Les gènes Mash1, Math et les neurogénines sont exprimés par les neurones en différenciation. Les neurogénines 1 et 2 sont essentielles et favorisent la neurogenèse dans le néocortex (Schuermans Guillemot 2002) et participent à l'inhibition de la différenciation astrocytaire (Sun *et al.* 2001, Nieto *et al.* 2001).

La voie de signalisation Notch/Hes participe au maintien de la balance entre le nombre de neurones formés et le nombre de progéniteurs. La voie de signalisation Notch favorise la transformation des progéniteurs du neuroépithélium en cellules gliales radiales au début du développement et favorise la différenciation des progéniteurs des cellules gliales radiales en astrocytes à la fin du développe-

ment (Anthony *et al.* 2005). Il existe quatre récepteurs Notch (Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4), et de nombreux ligands, comme Jagged 1 (JAG1) et JAG2, ainsi que les protéines Dll (delta-like) (Ables *et al.* 2011). Au cours du développement, l'activation de la voie Notch régule la prolifération des cellules souches neuronales. Une faible activation favorise la prolifération alors qu'une forte activation de la voie entraîne un arrêt du cycle cellulaire (Guentchev et McKay 2006). Notch est donc une voie qui participe à l'inhibition de la différenciation neuronale et favorise l'auto-renouvellement des cellules souches neurales.

Au cours de ma thèse, nous avons choisi d'étudier certains gènes proneuraux (Notch1, Mash1), participant directement au processus de différenciation neuronale.

Une autre voie de signalisation joue un rôle majeur dans la différenciation neuronale : la voie Wnt/ β catenine. Aux stades précoces du développement cortical, cette voie de signalisation favorise la différenciation vers la voie neuronale de la zone dorsale du télencéphale à l'origine du néocortex et de l'hippocampe en induisant la prolifération des progéniteurs (Lee et Jessell 1999, Hirabayashi et Gotoh 2005). En effet, une augmentation de l'expression de Wnt7a provoque l'arrêt du cycle cellulaire et induit la différenciation neuronale des progéniteurs. Une inhibition de la voie de signalisation Wnt entraîne une diminution de la différenciation des progéniteurs (Hirabayashi *et al.* 2004). La voie de signalisation Wnt favorise la neurogenèse en induisant directement l'expression de la neurogénine 1 et 2.

D'autres facteurs jouent également un rôle dans la différenciation : les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor) et FGF (fibroblast growth factor), le Shh (facteur Sonic hedgehog), la protéine BMP (Bone morphogenic proteins) et l'acide rétinoïque. Les facteurs FGF et Shh favorisent l'auto-renouvellement alors que l'acide rétinoïque favorise la différenciation neuronale (Corbin *et al.* 2011).

1.2.1.2.2.7 Processus de mort cellulaire

Le processus de mort cellulaire joue un rôle majeur pendant le développement du système nerveux central (SNC). Trois fonctions majeures de ce processus ont été établies : limiter le pool de cellules prolifératives, corriger les erreurs et éliminer les structures transitoires apparues au cours du développement et participer à l'établissement de connexions synaptiques appropriées. L'apoptose représente la principale voie de mort cellulaire. D'autres voies peuvent intervenir comme la nécrose ou l'autophagie. Cependant, la nécrose est un processus pathologique éliminant les cellules ayant subi un traumatisme (Oppeinheim 1991)

L'apoptose est un processus cellulaire intrinsèque impliquant une cascade d'activation de gènes pro et anti-apoptotiques. C'est un mécanisme essentiel impliqué dans la taille et la forme du cerveau en régulant le nombre et le type de cellules pendant les phases précoces du développement.

Au stade embryonnaire précoce E10 chez la souris, très peu de cellules en apoptose (1 %) sont présentes. À partir du stade E12, le nombre de cellules en apoptose augmente fortement pour atteindre un pic vers le stade E14 où 70 % des cellules corticales entrent dans le processus d'apoptose. Ce nombre diminue à 50 % au stade E18. Aux stades précoces de développement postnatal, entre P0 et P5, le processus d'apoptose est également retrouvé au niveau des progéniteurs transitoires (Derer et Derer 1990). Bien que les cellules en apoptose soient présentes sur toute la surface du cortex, la majorité se trouve dans les zones de proliférations actives par rapport aux régions où sont présents les neurones post-mitotiques. Par conséquent, à ces stades de développement, la majorité des cellules entrant en apoptose sont des cellules souches ou des progéniteurs (Blascke *et al.* 1998).

La voie apoptotique participe à la sélection des cellules corticales appropriées avant leur différenciation finale en neurones, permettant l'établissement de connexion entre les neurones et leurs cibles (Cowan *et al.* 1984). Pendant la phase de synaptogénèse, entre P14 et P15, le processus d'apoptose au niveau des neurones post-mitotiques participe à l'élimination des connexions synaptiques en excès ou non appropriées et représente 50 % de ces connexions.

Après la naissance, des cellules en apoptose sont également retrouvées dans le cortex cérébral mais correspondent majoritairement aux cellules gliales telles que les oligodendrocytes qui sont produits en excès pour assurer la myélinisation (McTigue et Tripathi 2008). De plus, pendant la deuxième semaine postnatale, les cellules Cajal-Retzius sont également éliminées par apoptose (Derer et Derer 1990).

Les facteurs neurotrophiques permettent la protection des cellules contre l'apoptose. Ces facteurs sont produits par les neurones cibles qui vont établir des connexions appropriées avec les neurones afférents (Huang et Reichardt 2001).

1.2.1.2.3 Développement de l'hippocampe

1.2.1.2.3.1 Structure de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure paire et symétrique appartenant au système limbique. Il joue un rôle dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire. Chez les rongeurs, il se situe dans le lobe temporal médian, sous la surface du cortex. La formation hippocampique est constituée de la corne d'Ammon, du gyrus denté, du complexe subiculaire (presubiculum, parasubiculum et subiculum) et du cortex entorhinal. La corne d'Ammon est subdivisée en trois parties : CA3, CA2 et CA1 et est

constituée de cinq couches principales : le stratum lacunosum moleculare (slm), le stratum radiatum (sr), pyramidale (sp) et oriens (so) et l'alveus. Le gyrus denté (GD) est constitué de trois couches de cellules : la couche moléculaire (ml), la couche des cellules granulaires ou stratum granulosum (sg) et l'hilus (h) (figure 12).

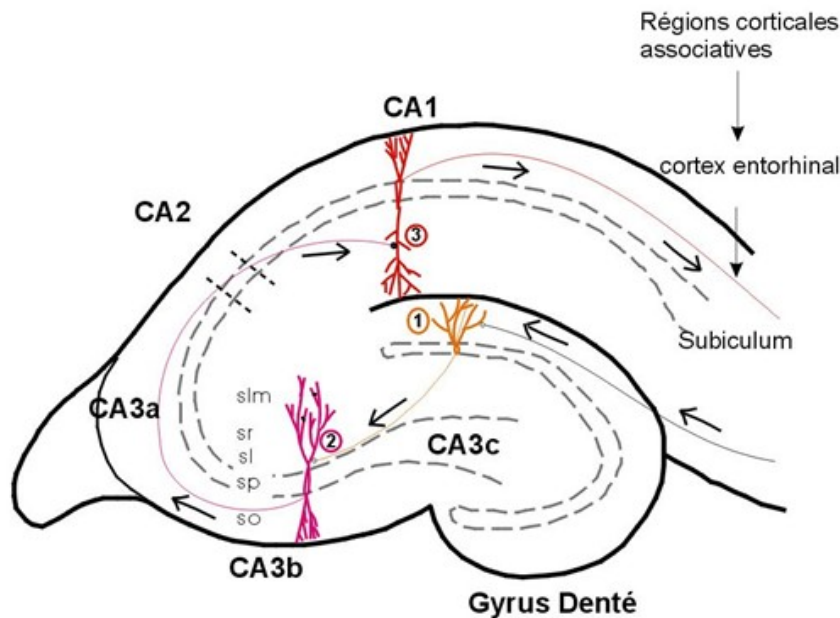


FIGURE 12 – Structures de l'hippocampe adulte (source : www.snv.jussieu.fr)

La corne d'Ammon, divisée en trois régions CA1, CA2 et CA3, est constituée de cinq couches principales : le stratum lacunosum moleculare (slm), le stratum radiatum (sr), pyramidale (sp) et oriens (so) et l'alveus. Le gyrus denté (DG) est constitué de trois couches de cellules : la couche moléculaire (ml), la couche des cellules granulaires ou stratum granulosum (sg) et l'hilus (h).

Les corps cellulaires des cellules pyramidales se situent dans la couche des cellules pyramidales. Les dendrites apicales des cellules pyramidales passent à travers le stratum radiatum jusqu'au stratum lacunosum moleculare, les dendrites basales sont localisées dans le stratum oriens. La morphologie des cellules pyramidales varient en fonction des régions de l'hippocampe. De la région CA3 à CA1, les corps cellulaires deviennent plus petits et les dendrites apicales plus longues.

Les corps cellulaires des cellules granulaires du gyrus denté sont plus petits et plus arrondis que ceux des cellules pyramidales. Chaque cellule possède une ou plusieurs dendrites apicales dans la couche moléculaire. Les cellules granulaires envoient leurs projections axonales, appelées les fibres moussues, vers le stratum radiatum du CA3.

Les connexions efférentes du cortex entorhinal reconnaissent leurs cibles appropriées dans le GD et la région CA3. Ces premières connexions cortex entorhinal-hippocampe ont d'abord été en contact avec les cellules Cajal-Retzius comme cible transitoire qui servent de guides de migration pour les

connexions entorhinal afférentes (Ceranik *et al.* 2000). Les neurones pyramidaux de la région CA3 se connectent aux fibres moussues pour former des synapses (Gonzales *et al.* 2001). Les fibres moussues atteignent leur forme adulte au stade postnatal P45 (Bagri *et al.* 2003).

L'organisation fonctionnelle de l'hippocampe est décrite selon un circuit tri-synaptique. Les neurones des couches II et III du cortex entorhinal projettent leur axone sur les cellules granulaires du gyrus denté *via* la voie perforante et forment une première synapse. Ces cellules granulaires envoient des projections axonales sur les cellules pyramidales de la région CA3 *via* les fibres moussues et forment la deuxième synapse. Les axones des cellules pyramidales de CA3 (ou collatéral de schaffer) se projettent alors vers la région CA1 et forment la troisième synapse. Enfin, les cellules pyramidales de CA1 renvoient leur axone dans la couche profonde du cortex entorhinal (figure 12).

1.2.1.2.3.2 Types de neurones

Dans l'hippocampe, nous pouvons distinguer principalement deux types de cellules neuronales. Les cellules pyramidales et granulaires (90 %) sont excitatrices et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Les cellules inhibitrices ou interneurons (10 %) utilisent comme neurotransmetteur le GABA.

1.2.1.2.3.3 Étapes de formation de l'hippocampe

L'hippocampe se forme à partir de la région dorso-médiane du télencéphale. Son développement se déroule de façon similaire à celui du néocortex. Chez le rat, la région hippocampique débute sa formation durant le stade embryonnaire (E15-E21) et se poursuit jusqu'au stade postnatal (P20-30) (figure 13). Les neurones de l'hippocampe prennent naissance à partir du neuroépithélium, composé de trois structures : le neuroépithélium Ammonic (bleu), qui donne naissance aux cellules pyramidales et aux neurones des strata oriens et radiatum de la corne d'Ammon, le neuroépithélium denté (rose), qui donne naissance aux cellules granulaires et aux neurones du hile, et le glioépithélium (vert), qui génère les cellules gliales dans la fimbria (figure 14).

Comme les autres régions du neuroépithélium cortical, l'hippocampe est initialement composé par les cellules Cajal-Retzius et les cellules gliales (Alcantara *et al.* 1998). Les cellules Cajal-Retzius ont un rôle identique dans le cortex et l'hippocampe et sont indispensables à la migration des neurones des régions de la corne d'Ammon (CA) et du gyrus denté (GD) (Barry *et al.* 2008). Ces cellules jouent également un rôle dans le développement des connexions hippocampiques à la fin du développement (Del Rio 1997). Comme dans le neuroépithélium cortical, les cellules gliales radiales ont un rôle de soutien à la migration neuronale.

NEURO-GENETIC TIMETABLES IN EACH STRUCTURE	ESTIMATED TIME OF DEVELOPMENT IN MAN (IN WEEKS)															
	3.5-4.0	4.1-5.2	5.3-5.7	5.8-6.6	6.7-7.0	7.1-7.4	7.5-7.9	8.0-9.9	10.0-11.9	12.0-14.9	15.0-18.9	19.0-23.9	24.0-27.9	28.0-31.9	32.0-35.9	36.0-40.0
	EXPERIMENTALLY DETERMINED DATA IN RATS (IN DAYS)															
	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21-E22	P0-P3	P4-P7	P8-P11	P12-P15	P16-P19
HIPPOCAMPUS:																
FIELD CA1							■	■	■	■						
FIELD CA3ab						■	■	■	■							
FIELD CA3c							■	■	■	■						
DENTATE GRANULE CELLS												■	■	■	■	■

FIGURE 13 – Stade de formation des différentes structures de l'hippocampe (source : [Bayer et al. 1993](#))

La formation de la corne d'Ammon chez le rat s'effectue entre les périodes E16 et E20 alors que chez l'Homme elle s'effectue entre la 7^e et la 14^e semaine de grossesse. Chez le rat, le gyrus denté se développe majoritairement après la naissance alors que chez l'Homme il est formé entre la 12^e semaine de grossesse et la naissance.

1.2.1.2.3.4 Neurogenèse de l'hippocampe

Prolifération cellulaire. Le processus de prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe est similaire au cortex et ne sera pas détaillé dans cette partie. Cependant, dans l'hippocampe, la prolifération cellulaire commence plus tardivement et persiste après la naissance. Les neurones des régions hippocampiques sont majoritairement produits à partir de la zone ventriculaire et une plus faible proportion est produite à partir des progéniteurs basaux de la zone sous ventriculaire (ZSV) du neuroépithélium ([Kitazawa et al. 2014](#)).

La génération des neurones des différentes régions s'effectue de façon parallèle, mais selon des vagues de formation, des gradients et des pics de prolifération différents ([Bayer 1980](#)). Les premières cellules de l'hippocampe naissent à partir du stade embryonnaire E14 chez le rat avec un pic de prolifération jusqu'à E19. Les neurones de la corne d'Ammon sont générés entre E16 et E20 avec un pic à E17 pour la région CA3 et à E19 pour la région CA1. Concernant les couches cellulaires de la corne d'Ammon, les neurones des couches du stratum oriens, radiatum et lacunosum moléculaire sont générés entre les périodes E15-E17, les neurones de la couches des cellules pyramidales pendant les périodes E17-E19 ([Bayer 1980](#)).

Le gyrus denté est la dernière structure de la formation hippocampique à apparaître. En effet, 85 % des cellules granulaires sont générées après la naissance, dont 10 % après P18. Chez le rat, leur génération commence au stade E17 à partir du neuroépithélium denté primaire, avec un pic durant la première semaine postnatale. Le gyrus denté devient mature au bout de 30 jours postnatals ([Bayer 1980](#)).

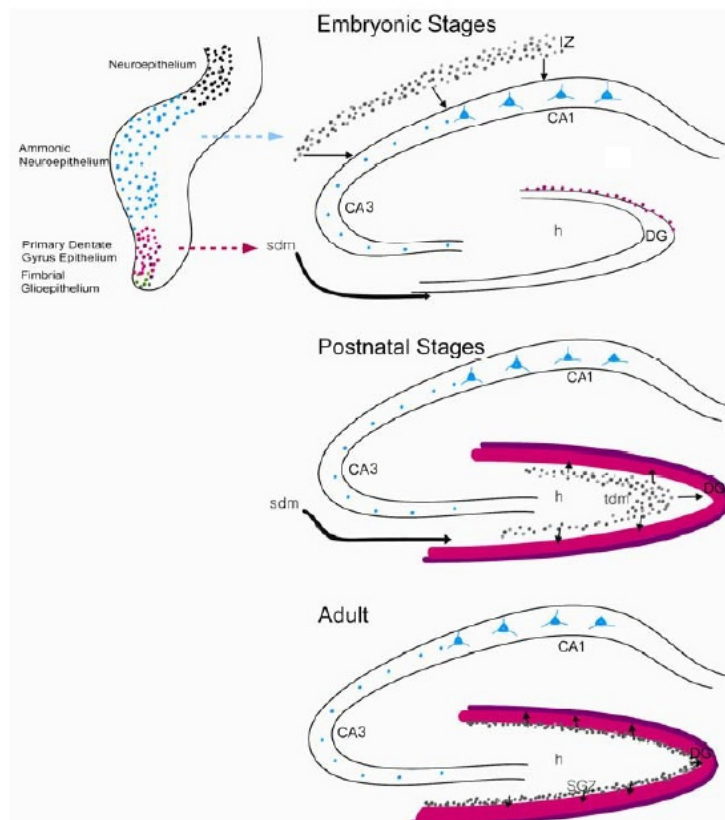


FIGURE 14 – Formation de l'hippocampe aux stades prénatal et postnatal (d'après Hippocampal development Bae 2007)

Les neurones de l'hippocampe prennent naissance à partir du neuroépithélium, composé de trois structures : le neuroépithélium ammonic (bleu), qui donne naissance aux cellules pyramidales et aux neurones des strata oriens et radiatum de la corne d'Ammon, le neuroépithélium denté (rose), qui donne naissance aux cellules granulaires et aux neurones du hile, et le gliopithélium (vert), qui génère les cellules gliales dans la fimbria. CA : corne d'Ammon, DG : gyrus denté, H : Hile, SDM : second dentate matrix.

Migration neuronale. Une fois formés, les neurones pyramidaux de la région CA1 suivent une migration radiale. Les neurones post-mitotiques formés quittent la zone ventriculaire (ZV) et se transforment en cellules multipolaires en migrant lentement vers la zone intermédiaire. Chez le rat, les cellules générées à E12 gardent leurs propriétés multipolaires pendant 1 jour alors que celles générées à E15-E16 les gardent pendant 3-4 jours. Quand les neurones pyramidaux migrent dans la zone intermédiaire, ils se transforment en cellules bipolaires. Ces neurones migrent vers la plaque hippocampique (future stratum pyramidale) *via* les cellules gliales radiales qui jouent un rôle de guide dans la migration neuronale et étendent leurs prolongements de la ZV jusqu'à la surface de la plaque hippocampique. Les fibres gliales persistent jusqu'à P10, puis disparaissent. Juste avant d'atteindre la plaque hippocampique, les neurones étendent un ou deux prolongements majeurs ramifiés avec de multiples prolongements plus fins en contact avec les fibres des cellules gliales ra-

diales. Quand ils migrent au sein de la plaque hippocampique, les corps cellulaires des neurones migrent par translocation de façon à atteindre le haut de la plaque hippocampique.

La migration des neurones de la région CA3 est similaire à la région CA1 avec une transformation morphologique multipolaire, mais ils restent plus longtemps (4 jours) dans la zone intermédiaire. La migration des cellules rejoignant la région CA3 est plus complexe et plus longue (1 jour) due à la courbe de la route de migration depuis la zone ventriculaire. La plaque hippocampique est donc reconnaissable à partir de E20 pour la région CA1 et à partir de E22 pour la région CA3 (Altman et Bayer 1990).

La migration des cellules du gyrus denté pendant le développement est complexe et légèrement différente de la corne d'Ammon. Au stade E18, quelques cellules sont générées dans la zone ventriculaire du neuroépithélium denté primaire et migrent pour former la matrice dentée secondaire. Dans cette première route de migration, les cellules gardent une forte activité prolifératrice (Li *et al.* 2009) et présentent une morphologie bipolaire ou multipolaire (Nakahira et Yuasa 2005). Les cellules migrent ensuite *via* les cellules gliales radiales vers la zone supra-granulaire. À ce stade, les cellules ont une forme uni ou bipolaire. Aux stades embryonnaires tardifs et postnatals précoces, la seconde route de migration apparaît dans laquelle les cellules migrent jusqu'au futur hile (figure 15). Ces cellules gardent une capacité prolifératrice élevée et vont former la matrice dentée tertiaire. Les neurones générés à partir de cette dernière matrice forment ensuite le gyrus denté. Les cellules granulaires vont adopter une localisation dépendant de leur date de naissance, les cellules les plus anciennes se positionnent en périphérie de la couche des cellules granulaires et les cellules nouvellement formées en profondeur (Altman et Bayer 1990, Rakic *et al.* 1981). Dans le mois suivant la naissance, la matrice dentée tertiaire donnera naissance à la zone sous-granulaire à l'âge adulte, qui constitue une zone de neurogenèse active (Altman et Bayer 1990).

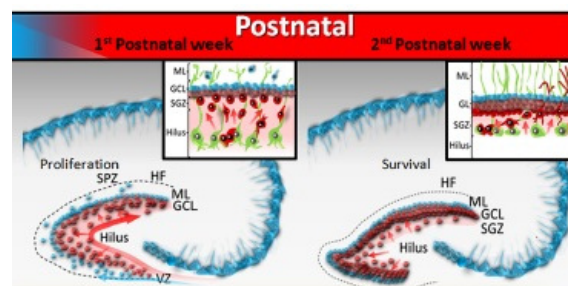


FIGURE 15 – Développement du gyrus denté aux stades postnatals (source : Lajud 2015)

Pendant la première semaine postnatale, les cellules précurseurs vont former une nouvelle zone proliférative au niveau du hile (zone rouge). Puis, pendant la deuxième semaine postnatale, la niche neurogénique est confinée à la zone sous-granulaire du gyrus denté. SGZ : subgranular zone, GCL : granular cell layer, ML : molecular layer, SPZ : subpyramidal zone.

De façon similaire aux neurones du cortex, après avoir atteint leur emplacement définitif, les neurones hippocampiques émettent leur axone vers leur cible spécifique pour établir des contacts synaptiques, permettant la formation des réseaux neuronaux. À la fin du développement, les cellules gliales radiales se transforment en astrocytes.

Voies de signalisation neuronales. Le développement de l'hippocampe se fait à partir de la région médiane du neuroépithélium cortical. Par conséquent, les voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement, la prolifération ou la différenciation neuronale sont en partie communes avec le cortex. Les molécules qui régulent le développement du gyrus denté et en particulier qui déterminent la voie de différenciation sont encore peu caractérisées.

La voie de signalisation Wnt joue un rôle essentiel dans le développement de l'hippocampe. Le facteur Wnt3a favorise la prolifération des progéniteurs au niveau de la région médio-caudale du neuroépithélium cortical, qui donne naissance à l'hippocampe (Lee *et al.* 2000). L'expression de Wnt3a débute vers le stade embryonnaire E9 chez le rat, pendant lequel il participe à l'initiation du développement hippocampique en induisant la naissance de neurones hippocampiques (Lee *et al.* 2000). La voie de signalisation Wnt favorise l'expression de la protéine Emx2 qui est nécessaire à la croissance de l'hippocampe ainsi qu'à la migration des progéniteurs du gyrus denté (Oldekamp *et al.* 2004, Backman *et al.* 2005). Dans notre étude, nous avons choisi d'étudier le facteur Wnt3a, qui joue un rôle majeur dans le développement précoce de l'hippocampe.

De façon identique au neuroépithélium cortical, la voie de signalisation Notch joue un rôle important dans la régulation de la neurogenèse hippocampique en activant les gènes inhibiteurs basix helix-loop-helix (bHLH) tels que les gènes Hes ou Id (Benezra *et al.* 1990). Les neurogénines 1 et 2 participant à la détermination neuronale en initiant la transition vers la voie neuronale. D'autres gènes participent à la différenciation neuronale dont les gènes NeuroD/Beta2, la NeuroD2/NDRE, Math2/Nex1 et Math3. Cette deuxième catégorie régule les événements tardifs de la différenciation neuronale hippocampique (Pleasure *et al.* 2000).

La région du neuroépithélium denté donnant naissance aux cellules granulaires est différente des autres régions du neuroépithélium d'un point de vue moléculaire. Nous allons maintenant nous focaliser sur les voies de signalisation neuronales au niveau du gyrus denté. Comme au niveau du neuroépithélium cortical, la neurogénine 2 joue un rôle essentiel en induisant la voie de différenciation neuronale et en inhibant la voie astrogliale. La neurogénine 2, exprimée transitoirement par les progéniteurs du gyrus denté avant leur différenciation en cellules granulaires, induit l'expression de facteurs de transcription comme la neuroD et Math2 (Nieto *et al.* 2001). Les facteurs de transcription de la catégorie bHLH, incluant la neuroD et Math2 sont principalement exprimés dans les cellules granulaires post-mitotiques et sont donc impliqués dans le stade tardif de la différenciation

des neurones du gyrus denté (Miyata *et al.* 1999, Liu *et al.* 2000, Pleasure *et al.* 2000). La neurogénine 2 est aussi nécessaire pour la génération et l'expansion des progéniteurs du GD (Galichet *et al.* 2004).

En effet, le neuroépithélium denté exprime plus fortement les gènes Id2, Id3, Hes5 et Mash1 et plus faiblement les gènes Hes1 et Id4. Le développement du gyrus denté étant tardif, l'activation de ces facteurs inhibant la différenciation neuronale permet d'éviter une détermination prématurée vers la voie neuronale.

Mash1 est exprimé dans les cellules précurseurs dentées à tous les stades du développement et est un marqueur des cellules mitotiques. Par conséquent, les cellules gardant leur capacité de précurseurs continuent d'exprimer Mash1 et forment la matrice tertiaire du gyrus denté. Au niveau de cette matrice tertiaire, les cellules granulaires sont générées à partir des cellules exprimant Mash1 et ces cellules migrent radialement vers la couche des cellules granulaires en commençant à exprimer les marqueurs NeuroD, NeuroD2 et Prox1. Des cellules granulaires nées dans la zone sous ventriculaire et ayant migré jusqu'au gyrus denté sans l'influence de ces facteurs bHLH inhibiteurs commencent à exprimer la NeuroD et après avoir atteint le gyrus denté, les cellules expriment NeuroD2 et Prox1 (Pleasure *et al.* 2000) (figure 16).

La neuroD est exprimée dans les cellules granulaires immatures nouvellement formées tout au long du développement et son expression diminue au fur et à mesure de la maturation neuronale. Par conséquent, la NeuroD est impliquée dans la régulation de la maturation des cellules granulaires et dans leur intégration dans les réseaux neuronaux. La figure 17 représente l'expression temporelle et spatiale des principaux gènes impliqués dans le processus de différenciation neuronale au niveau de la couche des cellules granulaires.

Mort cellulaire. Pendant le développement de l'hippocampe, le processus d'apoptose est majoritairement observé après la naissance. Des cellules entrant dans le processus de mort cellulaire sont observées au niveau du futur stratum oriens de façon hétérogène. Elles sont prédominantes dans la région intermédiaire entre le subiculum et la région CA1 ainsi que dans les régions CA1 et CA3. Chez le rat, de P3 à P5, la présence de ces cellules s'étend à la couche du stratum pyramidale. À P5, la mort cellulaire est prédominante dans la région CA1 et dans la jonction CA2-CA3 et moins importante au niveau de CA3. Le processus d'apoptose n'est pas observé au niveau des strata radiatum et lacunosum moleculare.

Dans le gyrus denté, le processus de mort cellulaire est mis en évidence essentiellement pendant la première semaine postnatale, au niveau du hile (Ferrer *et al.* 1990) avec un pic à P6 et diminue à partir de P15 jusqu'à l'âge adulte (Gould 1991).

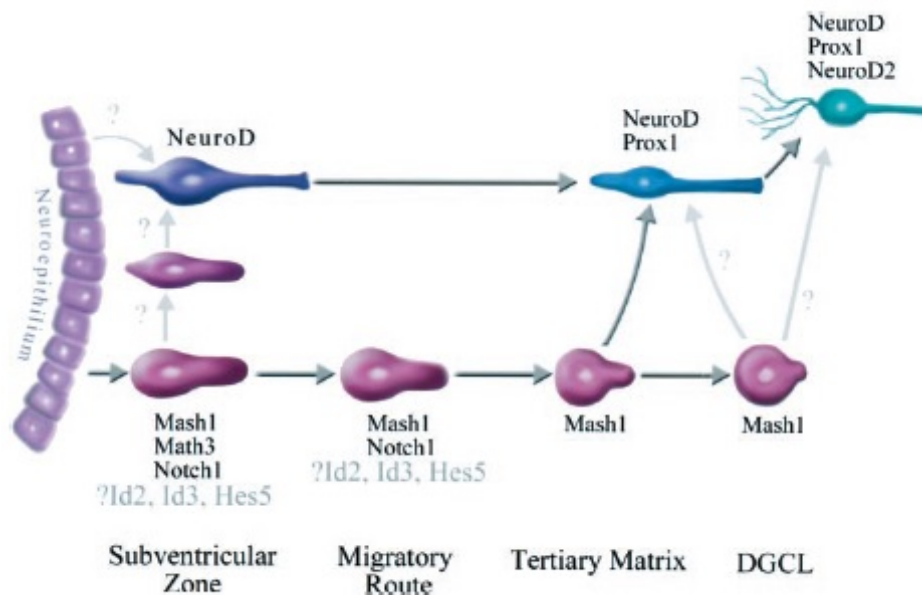


FIGURE 16 – Différenciation des cellules granulaires dans le GD en développement (source : [Pleasure et al. 2000](#))

Au niveau de la matrice denté tertiaire, les cellules granulaires sont générées à partir des cellules exprimant Mash1. Ces cellules migrent radialement vers la couche des cellules granulaires en commençant à exprimer les marqueurs NeuroD, NeuroD2 et Prox1. Des cellules granulaires nées dans la zone sous ventriculaire et ayant migré jusqu'au gyrus denté sans l'influence de ces facteurs bHLH inhibiteurs commencent à exprimer la NeuroD et après avoir atteint le gyrus denté, les cellules expriment NeuroD2 et Prox1. DGCL : dentate gyrus cell layer.

1.2.1.3 Le complexe neuro-vasculaire

Le cerveau en développement est plus sensible aux composés neurotoxiques qui peuvent atteindre le cerveau suite à une exposition. L'uranium est retrouvé dans le cerveau après exposition. Cependant, les mécanismes de son passage du sang vers le cerveau sont complexes et encore mal connus, aussi bien à l'âge adulte qu'au cours du développement (cf. 1.1.8.1). Dans cette partie seront décrits les différents composants du complexe neurovasculaire, sa fonctionnalité et sa maturation au cours du développement.

La barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue la plus importante surface d'échange entre le sang et le cerveau ([Pardridge et al. 2003](#)) et a pour fonction la protection du SNC et le maintien de son homéostasie (figure 18). Elle est située au niveau des cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux. Elle protège en effet le cerveau des composés endogènes ou exogènes pouvant circuler dans le sang et avoir un potentiel neurotoxique. La perméabilité de la barrière n'est pas uniforme pour toutes les substances potentiellement neurotoxiques ([Stern 1934](#)). Cette barrière est également essentielle pour la régulation du passage des nutriments, acides aminés assurant le bon fonction-

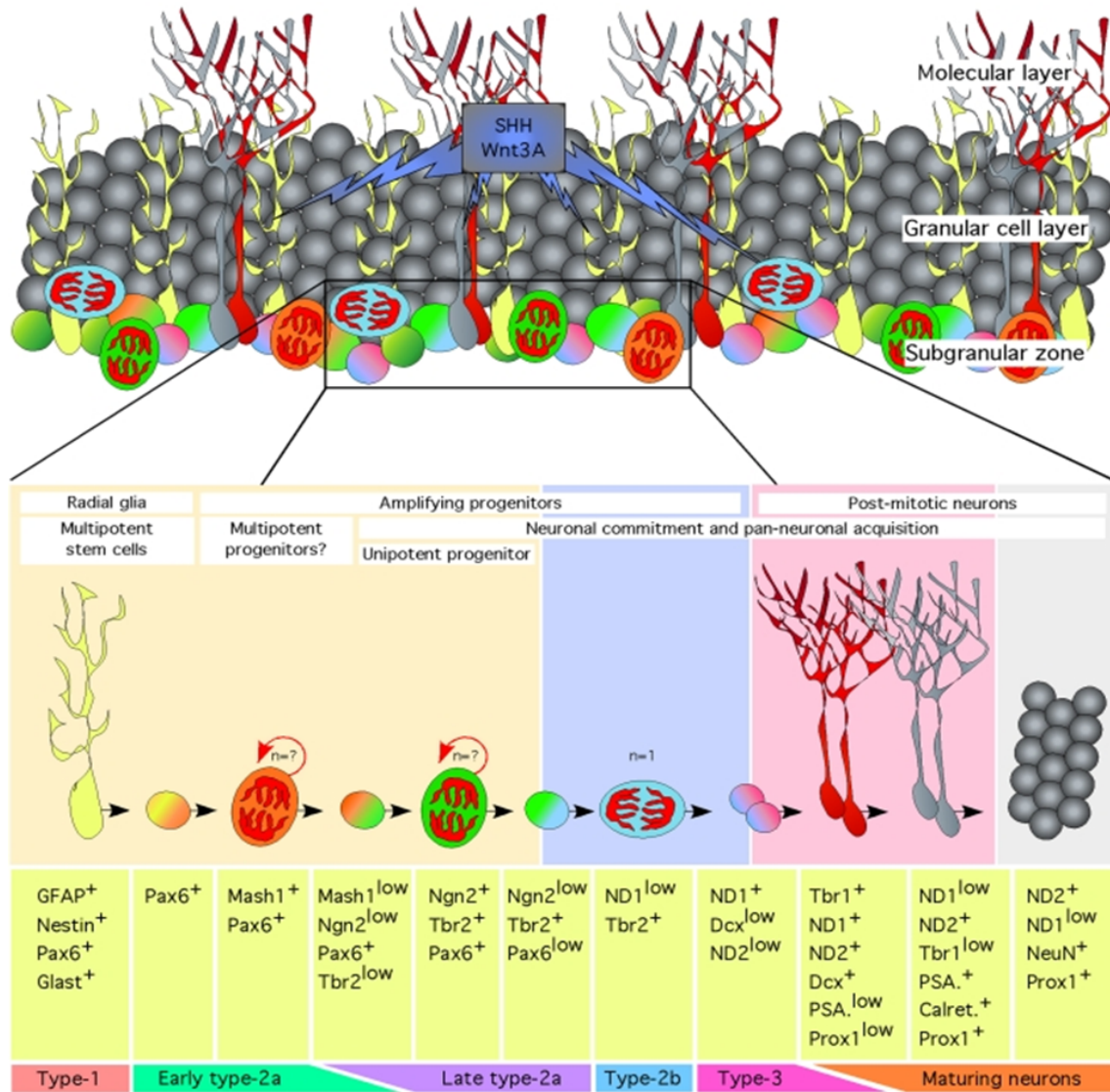


FIGURE 17 – Expression temporelle et spatiale des principaux gènes impliqués dans le processus de différenciation neuronale au niveau du gyrus denté de l’hippocampe aux stades postnatals (source : Roybon *et al.* 2009)

Le processus de différenciation neuronale au niveau du gyrus denté de l’hippocampe nécessite une coordination temporelle et spatiale dans l’expression des facteurs intrinsèques et extrinsèques. Les cellules gliales radiales exprimant les gènes GFAP/Nestin/Pax6/Glast⁺ donnent naissance aux progéniteurs multipotents exprimant les gènes Pax6/Mash1⁺. Ces progéniteurs ont une forte capacité de prolifération. Les progéniteurs exprimant la neurogénine 2 (Ngn2) subissent des divisions asymétriques pour accroître l’amplification cellulaire. Puis ils vont se diviser de façon symétrique en exprimant la NeuroD. Ces progéniteurs exprimant la NeuroD vont se différencier en neurones matures et vont exprimer les facteurs de transcription Tbr1, NeuroD2, Prox1 et les marqueurs cellulaires Dcx, PSA-NCAM, Calretinin et NeuN.

nement du cerveau, et a aussi une fonction d’élimination des déchets métaboliques provenant du cerveau (Hartz et Bauer 2011).

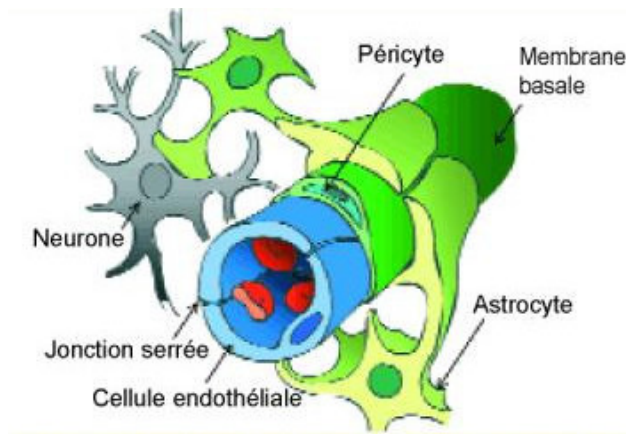


FIGURE 18 – Composants du complexe neurovasculaire (source : revmed . ch)

Le complexe neurovasculaire est composé par des capillaires cérébraux constitués de cellules endothéliales. La présence de jonctions serrées complexes et continues entre les cellules endothéliales limitant la diffusion paracellulaire, le manque de fenestration et la faible activité de pinocytose réduisent considérablement le passage de substance vers le SNC. Les péricytes régulent la formation des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales et déterminent la perméabilité vasculaire (Saunders *et al.* 2012). Les astrocytes tapissent les capillaires du cerveau et ont pour fonctions la nutrition des neurones, la régulation du milieu extracellulaire et le contrôle des réactions immunitaires (Obermeier *et al.* 2014). Le complexe neurovasculaire comprend également une activité enzymatique avec la présence de la monoamine oxydase, la Gama-glutamyltranspeptidase et des transporteurs d'efflux comme la P-glycoprotéine.

L'équipe de Stern a suggéré l'existence de deux principales voies d'entrée dans le cerveau en fonction de la substance examinée. L'une directement à travers les vaisseaux sanguins (les cellules endothéliales) et l'autre par le biais des plexus choroïdes (fluide cérébro-spinal) (Stern et Rapoport 1928, Stern et rapoport 1929) (figure 19).

Dans le cerveau adulte, il existe des zones où la BHE est absente. Ces organes circumventriculaires sont au nombre de 6 et incluent : l'organe subformical, l'organe vasculaire de la lame terminale, la neurohypophyse, l'épiphysse, l'organe subcommissural et l'area postrema. Ces organes sont néanmoins entourés de tancytes qui sont des épendymocytes avec des jonctions serrées très étanches.

Les études sur la fonctionnalité et l'intégrité de la BHE dans un cerveau en cours du développement sont très controversées. En effet, de nombreuses études suggèrent encore aujourd'hui que la BHE est immature voire absente chez les embryons, les fœtus et les nouveaux nés (Myers *et al.* 2009, Costa *et al.* 2010, Zeng *et al.* 2011). Cependant, ces études ont été remises en question et il est maintenant bien établi que la BHE est fonctionnelle chez les embryons et les fœtus et participe à la protection du cerveau en cours de développement. De plus, il a aussi été démontré la présence de mécanismes supplémentaires propres au cerveau en développement, tels qu'un transport sélectif de protéines du plasma à travers les plexus choroïde, ainsi qu'un transport plus important d'acides aminés qu'à l'âge adulte (Zhao *et al.* 2015).

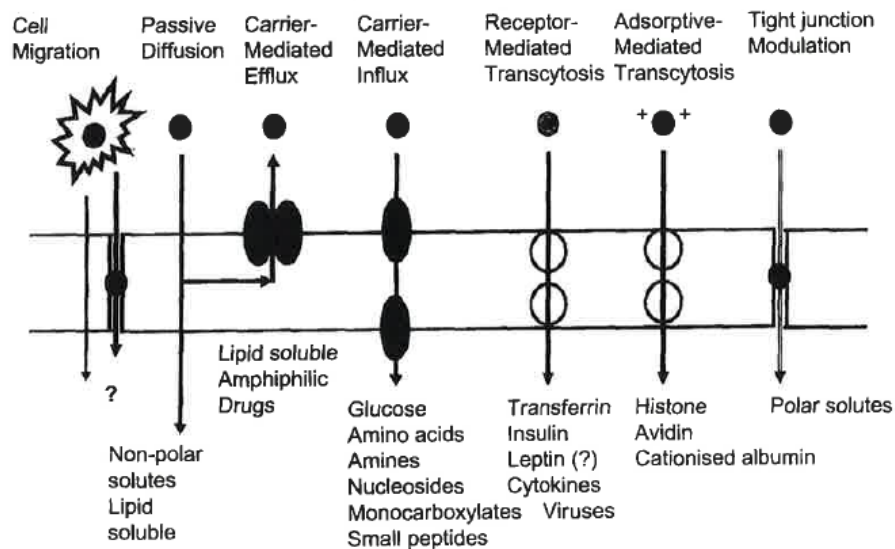


FIGURE 19 – Différents mécanismes de passage du sang vers le cerveau (source : www.snv.jussieu.fr)

Les molécules peuvent emprunter plusieurs voies de passage pour atteindre le cerveau, par passage transcellulaire ou paracellulaire, à l'aide de transporteurs spécifiques ou par transcytose.

Le développement de la BHE est un processus complexe qui comprend plusieurs phases : la vascularisation, l'angiogenèse et la formation de la barrière proprement dite. Le développement de la BHE commence dans les phases précoces du développement prénatal et continue pendant la période postnatale. Des progéniteurs de cellules endothéliales vont initier le développement de nouveaux vaisseaux ([Liebner et al. 2011](#)) qui se poursuit par le processus d'angiogenèse où les vaisseaux existants s'étendent au niveau du neuroectoderme embryonnaire et donnent naissance à des nouveaux vaisseaux. Chez les rongeurs, ce processus d'angiogenèse commence dès le stade embryonnaire E9 et permet la formation d'un réseau de capillaires indifférenciés ([Virgintino et al. 1998](#), [Liebner et al. 2011](#)). Ces premières ébauches de vaisseaux ont déjà des caractéristiques communes avec la BHE et notamment la présence de jonctions serrées et de transporteurs comme le transporteur du glucose (Glut1) ou de la transferrine et des acides aminés. Les cellules endothéliales des micro-vaisseaux établissent également un contact étroit avec les péricytes et les cellules astrogliales qui ont un rôle fondamental dans le développement et le maintien de la barrière. La BHE commence à se former entre les stades embryonnaires E11 et E17 chez la souris ([Abbott 2009](#)). Au stade E11 chez le rat, les jonctions serrées sont formées et deviennent plus complexes, limitant fortement le passage paracellulaire des macromolécules. Ceci confirme que les jonctions serrées fonctionnelles sont formées avant la naissance. Par conséquent, la BHE chez les embryons, les fœtus et les nouveau-nés protège le cerveau de molécules de faibles poids moléculaires ([Ek 2006](#), [Saunders et al. 2012](#)). Cependant,

la forte résistance électrique caractéristique d'une BHE mature n'est visible qu'à partir de E21 (Butt 1990, Abbott 2009).

De plus, au stade embryonnaire E16, le cerveau est très peu vascularisé, la vascularisation du cortex est effective seulement après la naissance. Au contraire, les plexus choroïdes sont formés rapidement pendant la gestation et participent grandement au transfert des molécules du sang au cerveau. Ces transferts du sang au cerveau et dans le fluide cérébrospinal à travers les jonctions sont présents dès les premiers stades du développement du cerveau pour d'importantes molécules comme le glucose, les acides aminés et les hormones (Johansson *et al.* 2008, Liddelow *et al.* 2009).

Bien que le système nerveux central soit protégé des perturbations extérieures, des molécules sont quand même capables de l'atteindre.

1.2.2 Persistance de la neurogenèse à l'âge adulte

La neurogenèse adulte a été mise en évidence dans les années 1960 par Altman qui a observé la naissance de nouveaux neurones dans des régions spécifiques chez le rat adulte, incluant le gyrus denté de l'hippocampe (Altman et Das 1965), le neocortex (Altman 1966) et le bulbe olfactif (Altman 1969). La neurogenèse adulte diffère de celle au cours du développement selon deux aspects fondamentaux. La neurogenèse adulte intervient dans un environnement non neurogénique où les structures sont déjà formées. Le microenvironnement est donc fondamental pour permettre une neurogenèse active, en protégeant les cellules des facteurs anti-neurogéniques par exemple. De plus, contrairement au développement, la neurogenèse adulte est un processus individuel et rare pendant lequel les cellules prolifèrent et se différencient individuellement.

1.2.2.1 Origine des cellules souches neurales à l'âge adulte

À l'âge adulte, deux zones germinatives actives sont encore présentes : la zone sous ventriculaire, associée avec la partie antérieure des ventricules latéraux du prosencéphale et la zone sous-granulaire, correspondant à la couche profonde du gyrus denté de la formation hippocampique.

Comme au cours du développement, la nature astrocytaire des cellules souches neurales dans la zone sous ventriculaire (Doetsch *et al.* 1999) et sous-granulaire a été mise en évidence. En effet, certaines cellules gliales radiales persistent après la naissance et à l'âge adulte et deviennent les progéniteurs pour la génération de nouveaux neurones et cellules gliales. Elles ont aussi un rôle de soutien dans la migration des cellules nouvellement formées vers leur emplacement définitif (Kriegsten *et al.* 2009) (figure 20).

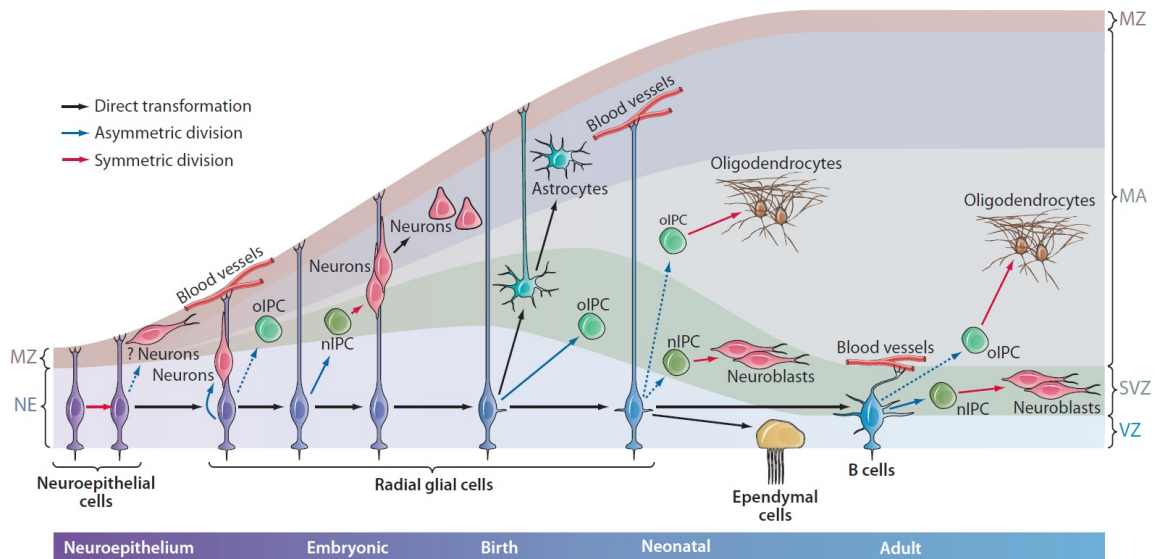


FIGURE 20 – Origines gliales des cellules souches à l'âge adulte (source : [Kriegsten et al. 2009](#))

Après la naissance, certaines cellules gliales radiales maintiennent leur contact apical et gardent leurs propriétés de cellules souches. Ces cellules continuent de générer des neurones et des oligodendrocytes par l'intermédiaire des progéniteurs nIPCs et oIPCs. Certaines cellules vont se transformer en cellules épendymales alors que les autres vont devenir les cellules souches (cellules de type B) dans la zone sous ventriculaire à l'âge adulte. Les cellules de types B maintiennent leur polarité apicale-basale en étant en contact avec le ventricule (apical) et avec les vaisseaux sanguins (basal). VZ : ventricular zone, SVZ : subventricular zone, MZ : marginal zone, MA : mantle, NE : neuroepithelium.

La neurogenèse des zones sous ventriculaire et sous-granulaire diffère considérablement et les facteurs favorisant l'une ou l'autre voie neurogénique sont différents. Les zones sous ventriculaire et sous-granulaire sont intimement liées au compartiment vasculaire, les facteurs sanguins jouant un rôle de régulation de la neurogenèse. Les cellules précurseurs au niveau de la zone sous ventriculaire ne sont pas identiques à celles de la zone sous-granulaire. Les deux types de population de progéniteurs sous ventriculaire et sous-granulaire génèrent respectivement les interneurons du bulbe olfactif et les cellules granulaires du gyrus denté.

La différence majeure entre les cellules souches de la zone sous ventriculaire est l'environnement glial. En effet, les cellules gliales radiales embryonnaires sont remplacées par une maille d'astrocytes formant une chaîne de migration jusqu'au bulbe olfactif ([Zhao et al. 2008](#), [Kriegsten et al. 2009](#), [Ming et Song 2011](#)).

Dans cette partie, nous nous intéresserons au processus de neurogenèse au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté, notre structure d'intérêt à l'âge adulte.

1.2.2.2 Neurogenèse dans la zone sous-granulaire du gyrus denté

La zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe est localisée à l'interface entre la couche des cellules granulaires et le hile, proche de la niche vasculaire (Palmer *et al.* 2000). Elle contient deux types de cellules en division : les cellules gliales astrocytaires et des petites cellules avec un noyau basophile.

1.2.2.2.1 Prolifération cellulaire

Les cellules souches neurales (cellules de type 1) ont des caractéristiques et la morphologie des cellules gliales. Elles expriment les marqueurs de cellules souches et astrocytaires (la nestine, la GFAP : glial fibrillary acidic protein) et ont les propriétés vasculaires et électrophysiologiques caractéristiques des astrocytes (Seri *et al.* 2001, Filippov *et al.* 2003). Leur corps cellulaire est triangulaire et elles possèdent un long prolongement apical vers la couche des cellules granulaires jusqu'à atteindre la couche moléculaire où il se disperse en plusieurs petits prolongements (figure 21).

Ces cellules souches neurales ont un cycle cellulaire de vingt trois heures avec une phase S durant dix heures (Brandt *et al.* 2012). Elles prolifèrent et donnent naissance à des progéniteurs d'amplification transitoires qui diffèrent par leur potentiel prolifératif et leur stade d'engagement vers la différenciation neuronale (cellules de type 2a, 2b et 3). La durée du cycle cellulaire des cellules de type 2 est de 27 heures avec une phase S de 14 heures et celle des cellules de type 3 est également de 23 heures avec une phase S de 10 heures (Brandt *et al.* 2012). Ces progéniteurs ont une capacité d'auto-renouvellement limitée.

1.2.2.2.2 Différenciation et migration neuronale

Les cellules de type 2 ont une capacité de migration tangentielle (Kuhn *et al.* 1996) et se divisent en sous-types, les cellules de types 2a et 2b toutes deux exprimant la nestine. La doublecortine, marqueur de différenciation neuronale, commence à être exprimée seulement par les cellules de type 2b. Les cellules de type 3 commencent à exprimer PSA-NCAM (polysialated form of neural cell adhesion molecule) (figure 21).

La majorité des progéniteurs passe à un stade post-mitotique transitoire trois jours après leur division initiale pendant lesquels ils se différencient en cellules granulaires immatures et migrent sur une courte distance dans la couche des cellules granulaires. Les cellules granulaires immatures étendent leurs projections axonales le long des fibres moussues jusqu'à la couche des cellules pyramidales de la région CA3 trois à cinq jours après leur division. Elles envoient leurs dendrites dans la direction opposée à travers la couche moléculaire, mais ne sont pas encore intégrées dans le réseau existant (Esposito *et al.* 2005).

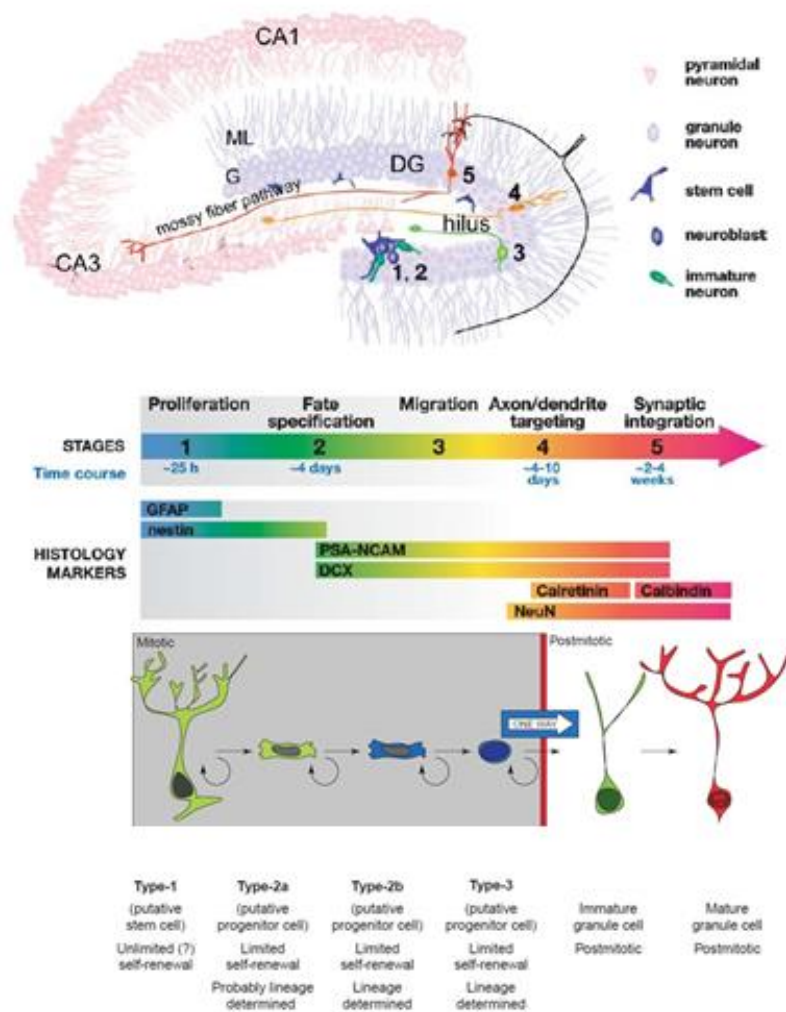


FIGURE 21 – Étapes de la neurogenèse et sous-types cellulaires de la zone sous-granulaire du gyrus denté à l'âge adulte (source : [Kemperman et al. 2004](#), [Ming et Song 2005](#))

La formation des nouvelles cellules granulaires dans le gyrus denté de l'hippocampe se déroule en 5 étapes. Les cellules souches (type 1) exprimant la GFAP et la nestine prolifèrent pour donner naissance à des progéniteurs transitoires (cellules de types 2a, 2b et 3). Ces progéniteurs se différencient en neurones immatures (type 4) et expriment la doublecortine (DCX). Ils migrent ensuite jusqu'à la couche des cellules granulaires. Les cellules granulaires (type 5) qui expriment la calretinine et le NeuN étendent alors leur projections axonales jusqu'aux cellules pyramidales de la région CA3 et leurs dendrites dans la direction opposées à travers la couche moléculaire. Les cellules granulaires matures exprimant la calbindine reçoivent des informations du cortex entorhinal et envoient des informations à la région CA3 et à l'hile.

1.2.2.2.3 Voies de signalisation neuronales

Comme au cours du développement, à l'âge adulte, de nombreuses voies de signalisation et facteurs jouent un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation des précurseurs neuronaux.

Cependant, les mécanismes contrôlant la détermination vers la voie neuronale sont encore mal connus.

La prolifération cellulaire est régulée par la voie de signalisation Wnt, dont le facteur Wnt3a produit par les astrocytes de la zone sous-granulaire stimule la neurogenèse en activant la multiplication des progéniteurs et des neuroblastes (Li *et al.* 2005). La voie de signalisation Notch participe aussi à la régulation de la prolifération cellulaire aux stades précoces de la neurogenèse. Le facteur Notch régule le cycle cellulaire et permet le maintien d'un stock de cellules souches dans les niches neurogéniques (Imayoshi *et al.* 2010).

De la même façon que pendant le développement embryonnaire, le facteur de transcription pro-neuronal bHLH est nécessaire pour la détermination vers la voie neuronale et pour la différenciation (Abrous *et al.* 2005). Ainsi, les gènes pro-neuronaux de la famille bHLH favorisent la différenciation neuronale et les gènes anti-neurogéniques bHLH inhibent la différenciation et maintiennent les cellules aux stades de précurseurs par l'intermédiaire du facteur Notch (Mehler 2002). Deux types de gènes pro-neuronaux sont distingués, les facteurs permettant la détermination vers la voie neuronale tels que Mash1, Math1 et les neurogénines qui sont exprimés dans les cellules mitotiques et les facteurs impliqués dans la différenciation neuronale, tels que NeuroD, NeuroD2 et Math2 qui sont exprimés plus tardivement, dans les cellules post-mitotiques (Bertrand *et al.* 2002). Les gènes inhibiteurs de la famille bHLH sont Notch, Hes et Id.

La voie de signalisation Sonic Hedgehog favorise également la prolifération des cellules souches et des progéniteurs dans la zone sous-granulaire (Lai *et al.* 2003).

1.2.2.2.4 Intégration synaptique

Les cellules granulaires immatures subissent un processus de sélection pendant lequel elles vont devenir fonctionnelles ou vont être éliminées. Deux à trois semaines après le stade post-mitotique, ces cellules expriment la calbindine et deviennent matures par intégration synaptique. Au seizième jour suivant leur formation, des épines dendritiques commencent à apparaître, formant des synapses avec les fibres d'axones afférentes venant du cortex entorhinal (Zhao *et al.* 2006, Toni *et al.* 2011). Entre quatre et six semaines, les cellules granulaires continuent progressivement leur maturation, ainsi que le développement de leur connectivité, et présentent une plasticité synaptique importante. Cette plasticité synaptique permet une grande capacité d'adaptation des circuits neuronaux nouvellement formés, ainsi que le maintien de la stabilité du circuit neuronal mature (Ge *et al.* 2007). Quatre à sept semaines sont nécessaires pour que les cellules possèdent les mêmes propriétés fonctionnelles que les cellules granulaires. Elles reçoivent des projections provenant du cortex entorhinal et envoient leurs informations dans le hile et à la région CA3.

1.2.2.2.5 Mort cellulaire

Dans le gyrus denté des rats adultes, environ dix mille nouvelles cellules naissent chaque jour dont 60 à 80 % meurent durant le premier mois après leur production (Cameron et McKay 2001, Dayer *et al.* 2003). Sur les 20 % de cellules survivantes, 14 % deviennent des neurones matures ou des astrocytes (Biebl *et al.* 2000, Dayer *et al.* 2003). L'apoptose est le principal processus de mort cellulaire à l'âge adulte et survient majoritairement pendant la phase de maturation des cellules nouvellement formées (Nacher *et al.* 2001). Cependant, des neurones matures peuvent aussi entrer en apoptose. La régulation de la production et de l'élimination des nouvelles cellules formées à l'âge adulte est essentiel pour le maintien d'un nombre constant de neurones.

1.2.3 Modulation physio-pathologiques de la neurogenèse

1.2.3.1 Conséquences à l'âge adulte d'une perturbation de la neurogenèse au cours du développement

La neurogenèse au cours du développement est un processus dynamique sensible à de nombreux stimuli physiologiques et pathologiques. Une perturbation dans ce processus pendant les périodes prénatale et postnatale peut entraîner des troubles dans la morphologie des différentes structures et couches du cerveau, ainsi que dans la mise en place et la fonctionnalité des réseaux neuronaux. Ceci peut conduire à des troubles des fonctions cérébrales supérieures à l'âge adulte.

Au cours du développement, l'embryon, le fœtus et le nouveau-né peuvent être exposés à des substances neurotoxiques, des radiations ionisantes, un stress maternel ou encore une pathologie maternelle pendant la gestation ou la lactation qui peuvent conduire à des perturbations de la neurogenèse. L'exposition à des substances potentiellement neurotoxiques pendant la gestation induit des perturbations de la neurogenèse associées à des troubles comportementaux. Par exemple, l'exposition *in utero* à l'alcool entraîne une augmentation de la perte neuronale, une altération de la morphologie neuronale au niveau du gyrus denté associées à une réduction des performances d'apprentissage et de mémoire à l'âge adulte (Gil-Mohapel 2010). Une exposition médicamenteuse pendant la gestation peut également induire des troubles de la neurogenèse. Le traitement du VIH par Azidothymidine connu pour être responsable de démence (Brew *et al.* 2015) entraîne une augmentation de la sénescence des cellules souches neurales, ainsi que des progéniteurs neuronaux et une diminution de la prolifération cellulaire (Demir *et al.* 2015). Une contamination par des composés chimiques, tels que le methylazoxymethanol, induit un arrêt de la prolifération cellulaire qui est associé à des troubles de la mémoire spatiale et une augmentation de l'activité locomotrice (Hazane *et al.* 2009). Enfin, une perturbation de la neurogenèse chez le rat pendant la gestation peut être à

l'origine de maladies neurodégénératives à l'âge adulte comme la schizophrénie, l'épilepsie ou des troubles cognitifs comme la dépression (Dobyns *et al.* 1996, Talamini *et al.* 1999, Lin *et al.* 2013).

Chez les rongeurs, les premières semaines postnatales, pendant lesquelles se forme majoritairement le gyrus denté, apparaissent comme plus sensibles et des perturbations pendant cette période peuvent avoir un impact sur la neurogenèse et les fonctions cérébrales à l'âge adulte (Kuhn et Blomgren 2011). Une exposition à un stress au cours du développement postnatal entraîne des perturbations dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire à l'âge adulte qui sont liées à des modifications dans la plasticité neuronale. Ces perturbations sont associées à une augmentation de la prolifération et de la différenciation cellulaire au cours du développement. À l'âge adulte, ces souris ont une diminution de la survie des cellules nouvellement formées au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté (Naninck *et al.* 2015).

Chez l'homme, des perturbations de la neurogenèse au cours du développement peuvent engendrer des anomalies structurales du cerveau. Un défaut de prolifération et de migration dans les progéniteurs neuronaux entraîne une microcéphalie (Mcmanus et Golden 2005). Au contraire, une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération cellulaire sont responsables d'une macrocéphalie (Grozner *et al.* 2001). Des perturbations temporelles et spatiales dans les différentes étapes de la neurogenèse au cours du développement peuvent être à l'origine de troubles intellectuels et d'épilepsie (Geschwind et Rakic 2013). Les principales malformations corticales observées sont dues à des perturbations dans la migration neuronale (Cocas et Pleasure 2014).

La neurogenèse au cours du développement cérébral est donc un processus dynamique pendant lequel des perturbations environnementales durant les périodes prénatale et postnatale peuvent avoir des conséquences sur les fonctions cognitives à l'âge adulte ou entraîner des pathologies neurodégénératives.

1.2.3.2 Corrélation entre la neurogenèse adulte hippocampique et les fonctions cognitives et émotionnelles

La neurogenèse adulte hippocampique est également un processus dynamique sensible à de nombreux stimuli physiologiques et pathologiques. L'hippocampe est une structure primordiale pour la formation de la mémoire. Il existe plusieurs types de mémoire qui sont régulés par différentes structures. L'hippocampe est impliqué plus particulièrement dans la mémoire épisodique à court terme et dans la mémoire spatiale (Squire 1992).

De nombreuses études chez les rongeurs montrent que l'intégration des neurones nouvellement formés dans les circuits neuronaux de l'hippocampe adulte pourrait avoir des contributions importantes dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Deng *et al.* 2008). La neurogenèse a

été mise en évidence également dans l'hippocampe humain (Eriksson *et al.* 1998) et est altérée par de nombreuses maladies neurologiques comme la dépression, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson, qui sont pour la plupart associées à un déficit des capacités cognitives (Zhao *et al.* 2008). La neurogenèse au niveau de l'hippocampe dorsal est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémoire, alors que la neurogenèse dans l'hippocampe ventral est impliquée dans le comportement affectif. De nombreux facteurs environnementaux qui affectent la neurogenèse induisent également des perturbations dans les performances cognitives (Paizanis 2007).

Depuis une dizaine d'années, l'implication de la neurogenèse hippocampique dans la dépression a été mise en évidence (Lee *et al.* 2012). En effet, la neurogenèse, et plus particulièrement les processus de prolifération et de différenciation neuronales sont perturbés chez des modèles d'animaux dépressifs (Wang *et al.* 2008, Roni *et al.* 2015). Ainsi, certains facteurs ont un effet stimulateur de la neurogenèse, d'autres ont, au contraire, un effet inhibiteur de la neurogenèse. Les principaux facteurs stimulant ou inhibant la neurogenèse seront détaillés par la suite.

1.2.3.2.1 Facteurs stimulants la neurogenèse

L'apprentissage de tâches dépendantes de l'hippocampe est le régulateur majeur de la neurogenèse adulte. En effet, l'apprentissage associé aux fonctions hippocampiques induit une augmentation du nombre et de la survie des cellules granulaires nouvellement formées, ce qui n'est pas observé avec l'apprentissage de tâches non dépendantes des fonctions de l'hippocampe (Gould *et al.* 1999, Leuner *et al.* 2004, Epp *et al.* 2007). Ceci est observé pour la mémoire spatiale mais également pour d'autres types d'apprentissage dépendant de l'hippocampe (Leuner *et al.* 2004, Hairston *et al.* 2005). D'autres études n'ont pas mis en évidence d'effet de l'apprentissage sur la survie des cellules granulaires (Dobrossy *et al.* 2003), ou ont montré au contraire une réduction de la survie des cellules (Ambrogini *et al.* 2004). Une des explications possibles est que l'apprentissage pourrait influencer différemment la survie des cellules en fonction de leur stade de développement. En effet, ces différentes études ont été réalisées dans des conditions différentes, principalement sur le protocole d'injection du bromodéoxyuridine (BrdU). L'apprentissage induit donc un effet dépendant du stade de maturation. Il a été montré que la survie est augmentée au niveau des cellules qui ont déjà commencé à former des synapses GABAergiques avec le réseau neuronal et qui peuvent être influencées par l'apprentissage ou la mémoire (Ambrogini *et al.* 2000, Ormerod *et al.* 2004, Epp *et al.* 2007, Deng *et al.* 2008). Une induction de l'apoptose est observée chez les cellules qui sont à un stade précoce de développement après apprentissage (Dupret *et al.* 2007). Pendant la dernière phase d'apprentissage, quand l'amélioration des performances diminue, une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une diminution du nombre de cellules granulaires nouvellement formées sont observées. Au même moment, l'apprentissage d'une autre tâche induit la prolifération des cellules (Dobrossy *et*

al. 2003). Ces résultats montrent que l'apprentissage augmente ou réduit sélectivement le nombre de cellules granulaires selon leur maturité et leur intérêt fonctionnel, ce qui confirme la dynamique de la neurogenèse.

Un environnement enrichi dans lequel les rongeurs sont stimulés par des objets ou des jeux permettant l'apprentissage ou l'interaction sociale améliore aussi la neurogenèse en augmentant la survie des cellules granulaires nouvellement formées (*Kempermann et al. 2000, Van praag et al. 2000*). L'impact sur la survie des cellules dépend également du stade de maturation des cellules. En effet, un environnement enrichi pendant au moins une semaine induit une augmentation de la survie de cellules âgées de moins de trois semaines et non sur les cellules plus âgées. De plus, un environnement enrichi améliore nettement les performances dans les tâches d'apprentissage et de mémoire comme le test de la piscine de Morriz, la reconnaissance d'objet, ou le labyrinthe en Y (*Bruel-Jungerman 2005, Tashiro et al. 2007*).

L'exercice physique a également un effet sur la neurogenèse. Chez le rongeur, la course volontaire entraîne une augmentation de la prolifération des cellules souches dans la zone sous-granulaire aussi bien des animaux jeunes que plus âgés (*Van praag et al. 1999, Van praag et al. 2005*) ainsi qu'une augmentation de la survie des cellules granulaires âgées de trois semaines (*Snyders et al. 2009*). La course volontaire améliore aussi les performances des animaux dans le test de la piscine de Morriz (*Van Pragg et al. 1999*).

Les antidépresseurs stimulent la neurogenèse par augmentation de la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe. Par exemple, l'administration chronique de fluoxétine induit une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux et la survie des cellules nouvellement formées au niveau de la zone sous-granulaire (*Warner-Schmidt et Duman 2006*). Les effets des antidépresseurs sont liés à des modifications dans les taux de sérotonine et de norépinephrine dans le cerveau. En effet, le taux de sérotonine dans le cerveau est corrélé avec le taux de prolifération cellulaire (*Santarelli et al. 2003*). Les taux de VEGF (vascular endothelial growth factor) et de BDNF (brain derived neurotrophic factor) jouent également un rôle dans la stimulation de la neurogenèse par les antidépresseurs (*Duman et Monteggia 2006*).

1.2.3.2.2 Facteurs inhibant la neurogenèse

La vieillesse est un des principaux facteurs modulant la neurogenèse. Une diminution de la neurogenèse chez le rongeur est observée progressivement entre deux mois et deux ans. Ceci n'est pas dû à une diminution du taux de survie des cellules nouvellement formées, ni à un changement métabolique du microenvironnement, mais à une diminution de la prolifération des cellules. Une diminution de taux de prolifération de 80 % est observée de vingt-huit jours (adolescence) à trois

mois (âge adulte), une diminution de 70 % de l'âge adulte à un an et une diminution de 60 % jusqu'à un âge de deux ans (Lemaire *et al.* 2000). De plus, un ralentissement dans la migration et la différenciation des cellules nouvellement formées est mis en évidence avec la vieillesse (Rao *et al.* 2005). Cette diminution de la neurogenèse s'accompagne d'une diminution de la plasticité synaptique et de troubles cognitifs tels que des diminutions de la mémoire spatiale (Morris 2006).

Le stress est connu pour engendrer des troubles de la neurogenèse quel que soit le type de stress subi (Mirescu et Gould 2006). Ainsi, un stress d'infériorité (Gould 1997), un stress d'intrusion (Gould 1998), un choc électrique (Malberg et Duman 2003), un stress de contention (Pham 2003), une isolation (Dong 2004), un stress lié à l'odeur d'un prédateur (Falconer et Galea 2003) engendrent tous des perturbations de la neurogenèse. Les effets du stress chez le rongeur mâle semblent être plus importants que chez la femelle (Falconer et Galea 2003). Des études ont montré que le stress diminuait la production de neurones (Pham *et al.* 2003, Mirescu et Gould 2006). Cependant, d'autres études ont montré que l'effet du stress à l'âge adulte était de courte durée avec une diminution de la prolifération cellulaire, mais suivie d'une augmentation de la survie des neurones (Tanapat *et al.* 2001). Une élévation des glucocorticoïdes pourrait être à l'origine de l'inhibition de la neurogenèse provoquée par le stress (Mirescu et Gould 2006).

De nombreuses substances neurotoxiques sont également capables d'induire des perturbations de la neurogenèse. Ainsi, il a été démontré que l'exposition aiguë ou chronique à l'alcool induisait une diminution de moitié de la prolifération cellulaire ainsi qu'une diminution de survie des cellules nouvellement formées dans la couche sous-granulaire du gyrus denté (Nixon *et al.* 2002). Ces perturbations de la neurogenèse hippocampique sont associées à des troubles cognitifs tels que des perturbations de la mémoire. Les récepteurs glutamatergiques de types acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) et GABA_A, ainsi que le stress oxydant, jouent un rôle dans cette perturbation de la neurogenèse (Herrera *et al.* 2003). Une exposition à la nicotine entraîne également une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'apoptose au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté (Abrous *et al.* 2002). Une exposition chronique aux dérivés du cannabis entraîne une inhibition de la neurogenèse par diminution de la différenciation des cellules nouvellement formées (Rueda *et al.* 2002). Une contamination aux métaux lourds comme le plomb et le cadmium induisent aussi des perturbations de la neurogenèse (Wang *et al.* 2013) et cet aspect sera développé dans la partie 1.3.

L'exposition à une irradiation à faible dose induit également des troubles de la neurogenèse. Une exposition à une irradiation à faible dose pendant la période néonatale entraîne une diminution du nombre de cellules souches et des progéniteurs neuronaux au niveau de la zone sous-granulaire du gyrus denté à l'âge de six mois, ainsi qu'une diminution du nombre de neurones matures. Ces

modifications sont associées à une augmentation de l'apoptose (Kempf *et al.* 2014). Une exposition aux radiations ionisantes aux stades prénatals entraîne également une diminution du nombre de cellules neuronales au niveau du cortex des rats adultes ainsi qu'une diminution de la prolifération neurogénique dans l'hippocampe des rats juvéniles (Verreet *et al.* 2015). De plus, une induction massive d'apoptose des cellules précurseurs neurales a été observée vingt-quatre heures après l'exposition de souris E14,5 à des radiations ionisantes (Nowak 2006).

L'ensemble de ces résultats montre que la neurogénèse est un processus dynamique pouvant être modulé de façon appropriée en fonction des stimuli extérieurs. La neurogénèse peut être ainsi stimulée par une augmentation du nombre de cellules nouvellement formées et par augmentation de leur survie. Cette stimulation améliore les capacités et les performances des animaux dans l'apprentissage de tâches directement liées aux fonctions de l'hippocampe. Ceci suggère qu'une augmentation de la neurogénèse est corrélée avec une augmentation de l'activité neuronale et améliore les fonctions comportementales (Deng *et al.* 2008). Au contraire, une inhibition de la neurogénèse, par diminution de la prolifération, de la différenciation, de la survie cellulaire ou par une augmentation de l'apoptose est associée à des altérations des fonctions cognitives, telles que l'apprentissage, la mémoire ou une augmentation de l'addiction à certaines substances.

La neurogénèse adulte hippocampique a donc un rôle fondamental dans les fonctions cognitives, telles que l'apprentissage et la mémoire (Cameron et Glover 2015). Elle participe également au maintien de la plasticité synaptique tout au long de la vie. Un dérèglement de la neurogénèse adulte peut donc aussi être à l'origine de maladies neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer et l'épilepsie sont associées à une stimulation de la neurogénèse (Sutula *et al.* 1989, Jin *et al.* 2004) alors que la dépression est associée à une inhibition de la neurogénèse (Sahay *et al.* 2007). De récentes études ont montré qu'une stimulation de la neurogénèse par différents facteurs peut modifier la progression de troubles cognitifs. Ainsi, le potentiel de la neurogénèse en tant que traitement de certaines maladies neurodégénératives commencent à être évoqué. Des études sont cependant encore indispensables pour comprendre les facteurs et les mécanismes régulant la neurogénèse afin de développer des traitements curatifs et préventifs dans les maladies neurodégénératives.

1.3 Uranium et neurogénèse : une neurotoxicité comparable aux métaux lourds

Par ses propriétés chimiques, la toxicité de l'uranium peut être assimilée à celles de certains métaux lourds. C'est pourquoi, dans cette partie nous nous sommes intéressés à la neurotoxicité des métaux lourds et plus particulièrement le lien entre les troubles du comportement et les perturbations du processus de neurogénèse.

Chez l'Homme, il est maintenant bien établi qu'une exposition aux métaux lourds tels que le cadmium, le plomb ou encore le manganèse pendant le développement cérébral induit des troubles des fonctions cérébrales supérieures (Tatcher 1982, Canfield 2003, Tatcher 1982, Cao 2009).

Plusieurs études expérimentales ont mis en évidence des troubles des fonctions cérébrales supérieures suite à une exposition au plomb pendant le développement. Une exposition au plomb pendant la gestation ou la lactation entraîne des déficits dans les capacités d'apprentissage et une diminution de la mémoire spatiale chez des rats âgés de vingt-et-un jours (Jett *et al.* 1995, Nihei *et al.* 2000, Yang *et al.* 2003). Il a également été montré qu'une exposition au plomb pendant le développement cérébral précoce induit des perturbations d'apprentissage et de mémoire spatiale chez le rat adulte qui persistent malgré l'arrêt de la contamination au sevrage. Au contraire, une exposition seulement après le sevrage n'engendre pas de perturbation de la mémoire spatiale (Kuhlmann *et al.* 1997).

Une exposition au cadmium chez le rat pendant la période prénatale, puis pendant huit semaines postnatales a mis en évidence des diminutions de l'activité exploratoire horizontale et verticale, ainsi qu'une diminution de la fréquence d'exploration à l'âge de douze semaines (Desi *et al.* 1998). Une diminution de l'anxiété, ainsi qu'un retard dans le développement des réflexes, ont été décrits suite à une exposition au cadmium pendant la période gestationnelle E7-E15 (Minetti *et al.* 2005). Une exposition prénatale au cadmium chez des femelles gestantes induit une diminution de la performance de la coordination motrice, une diminution de l'activité motrice, ainsi qu'une augmentation du comportement agressif des rats (Lehotzky *et al.* 1989). Une exposition aux métaux lourds pendant le développement cérébral entraîne donc des perturbations qui peuvent subsister à l'âge adulte même après l'arrêt de la contamination. Les mécanismes de neurotoxicité des métaux lourds sont multiples et sont encore mal connus. Une perturbation de la neurogénèse pourrait être en partie à l'origine de ces troubles comportementaux.

Des études expérimentales ont mis en évidence les effets des métaux lourds sur la neurogénèse au cours du développement cérébral. Ainsi, une exposition au plomb depuis la période gestationnelle jusqu'à l'âge adulte entraîne une diminution de la prolifération des cellules dans le gyrus denté de l'hippocampe (Verina *et al.* 2007). Une exposition au plomb à partir de la naissance et jusqu'à l'âge de trente jours postnatals entraîne également une diminution de cellules nouvellement formées dans le gyrus denté des rats âgés de 3 mois (Jaako Movitz *et al.* 2005). Une autre étude a montré qu'une exposition au plomb pendant le développement prénatal et postnatal induisait une diminution de la survie des cellules nouvellement formées chez des rats âgés de 2,5 mois mais n'a pas mis en évidence de perturbation de la prolifération cellulaire (Gilbert *et al.* 2005). De plus, une augmentation du nombre de cellules apoptotiques a été décrite dans le cortex et l'hippocampe de

souris après injection de plomb à sept et quatorze jours après la naissance (Dribben *et al.* 2011) et dans l'hippocampe de rats âgés de trois mois après une exposition au plomb par perfusion intra gastrique pendant six semaines (Liu *et al.* 2010).

Une exposition au plomb démarrante dès le stade *in utero* et se poursuivant jusqu'à vingt-et-un jours postnatals induit une diminution de la prolifération et de la survie des cellules dans le gyrus denté de l'hippocampe chez des rats âgés de 2,5 mois. La détermination vers la voie neuronale ou astrocytaire n'est pas perturbée par le plomb. Cependant, les cellules granulaires immatures présentent une morphologie dendritique aberrante avec une réduction de la longueur et de la densité des dendrites apicales. Les auteurs suggèrent que ces perturbations pourraient être à la base des déficits de la plasticité synaptique et des perturbations dans la mémoire spatiale observées après intoxication au plomb (Verina *et al.* 2007).

L'ensemble de ces études montre que l'exposition à certains métaux lourds au cours du développement entraîne à la fois des troubles des fonctions comportementales, intellectuelles et cognitives ainsi que des troubles de la neurogenèse. Cependant, une corrélation directe entre les troubles du comportement et les altérations de la neurogenèse n'a pas encore été clairement démontrée chez les rongeurs. Une étude a néanmoins démontré cette corrélation sur un autre modèle expérimental, le zebrafish. En effet, un ralentissement des mouvements et de l'activité du zebrafish pendant la nage ainsi qu'une diminution de l'action de s'échapper suite à un contact ont été décrits suite à l'exposition au plomb. Ces troubles comportementaux ont été reliés à une augmentation de l'apoptose des neurones (Dou et Zhang 2011). De plus, l'équipe de Guilarte a démontré que l'exposition à un environnement enrichi reversait les effets cognitifs sur la mémoire spatiale et les effets moléculaires liés à l'intoxication au plomb pendant le développement (Guilarte *et al.* 2003). Enfin, les capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale sont associées avec la neurogenèse au niveau des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe (Drapeau *et al.* 2008). De la même façon, les troubles du comportement induits par l'uranium pourraient être associés à des troubles de la neurogenèse.

1.4 Problématique

Du fait de sa dissémination dans l'environnement, l'uranium présente un risque pour les populations civiles. De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont démontré que l'uranium avait un impact sur les fonctions cérébrales, notamment certaines fonctions comportementales et cognitives.

Bien que certains mécanismes d'action potentiels pouvant être responsables de ces effets ont été explorés, tels que le système cholinergique et la balance pro/anti oxydante, il semble que les mécanismes d'action de l'uranium sont multiples. Dans le cerveau, deux structures sont particulièrement

impliquées dans les troubles des fonctions cognitives : le cortex et l'hippocampe. À l'âge adulte, il est clairement établi une corrélation entre des perturbations dans le processus de la neurogenèse au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et des troubles cognitifs. Une perturbation dans le processus de neurogenèse pourrait être impliquée et contribuer à la compréhension de troubles comportementaux et cognitifs engendrés par l'uranium. De plus, la plupart des études se sont intéressées aux effets de l'uranium sur les fonctions cérébrales à l'âge adulte et ce n'est que récemment que des études chez le rat ont montré qu'une exposition à l'uranium pendant le développement prénatal et postnatal engendrait également des troubles des fonctions cérébrales.

Le système nerveux central se développe sur une longue période, de l'embryogenèse jusqu'à la puberté. Une perturbation liée à des composés neurotoxiques ou à l'environnement extérieur pendant les périodes critiques du développement cérébral peuvent avoir un impact sur les fonctions cérébrales à l'âge adulte. En effet, il a déjà été démontré qu'une perturbation de la neurogenèse pendant le développement, par d'autres métaux lourds ou par une irradiation, induisait des troubles des fonctions comportementales à l'âge adulte. Le cerveau en développement est donc plus sensible à des perturbations extérieures et à des composés neurotoxiques qui peuvent avoir des effets à long terme irréversibles ([Liu et Lewis 2012](#)).

Sur les territoires contaminés, l'ensemble de la population civile peut être exposé à l'uranium, incluant des populations plus sensibles comme les femmes enceintes ou les enfants. Une exposition à l'uranium pendant le développement du cerveau, que ce soit pendant les périodes prénatale ou postnatale, pourrait avoir des conséquences plus importantes sur les fonctions cérébrales. Il est donc important d'étoffer les données concernant ces populations à risque. La formation des nouveaux neurones, que ce soit au cours du développement ou à l'âge adulte, pourrait être une cible potentielle de l'uranium. Une perturbation dans le processus de neurogenèse au cours du développement pourrait avoir des conséquences sur la mise en place des réseaux neuronaux et sur la morphologie des différentes structures du cerveau, alors qu'une perturbation de la neurogenèse à l'âge adulte pourrait avoir un impact sur l'intégration des nouveaux neurones au sein des réseaux déjà formés et induire un déficit dans la plasticité synaptique.

C'est pourquoi, au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux effets de l'uranium sur le processus de neurogenèse suite à une exposition pendant les périodes prénatale et postnatale ainsi qu'à l'âge adulte. Afin de mimer l'exposition des populations civiles, nous avons étudié le processus de neurogenèse chez le rat suite à l'ingestion d'eau de boisson contaminée à deux concentrations (40 et 120 mg/L) dès le stade E1, sur différents stades de développement (stade embryonnaire E13, stade fœtal E18, stades postnatals P0, P5 et P21) et au stade adulte (2 mois). Ces concentrations ont été choisies en fonction des concentrations maximales d'uranium retrouvées dans l'environnement et

de la sensibilité de notre modèle d'étude à l'uranium. Les animaux ont donc été exposés durant toute leur vie, pendant la gestation, la lactation et par eau de boisson suivant les stades étudiés. Sur ces différents stades, nous avons réalisé des études morphologiques, de prolifération et de mort cellulaire, ainsi que des études de différenciation neuronale. En parallèle de ma thèse, des études comportementales ont été réalisées au stade P21 et à deux mois où nous avons étudié les activités locomotrice et exploratrice, la mémoire spatiale et la dépression, afin de pouvoir corréler d'éventuelles perturbations dans le processus de neurogenèse avec des troubles comportementaux. Les résultats obtenus au cours de ma thèse permettront donc d'explorer un nouveau mécanisme d'action potentiel de l'uranium pouvant être en partie responsable des troubles du comportement observés, ainsi que d'approfondir les connaissances sur les effets de l'uranium sur une population plus sensible.

2 Matériels et méthodes

2.1 Protocole de contamination des animaux

2.1.1 Uranium

La solution d'uranium appauvri obtenue est réalisée par dissolution de cristaux de nitrate d'uranyle hexahydraté, de formule chimique $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et de poids moléculaire 502,13 g/mol, provenant de pastilles d' UO_2 (Areva-Cogema, Pierrelatte, France). L'uranium appauvri utilisé possède une activité spécifique de $1,4 \times 10^4$ Bq/g et sa composition isotopique est la suivante : ^{238}U à 99,74 %, ^{235}U à 0,26 % et ^{234}U à 0,001 %. Les pastilles d' UO_2 sont dissoutes dans du HNO_3 pour obtenir du nitrate d'uranyle hexahydraté. Ce nitrate d'uranyle est dilué dans l'eau Evian afin d'obtenir des solutions de 40 mg/L et de 120 mg/L.

2.1.2 Protocole de contamination

Les études ont été menées à partir de rattes gestantes Sprague Dawley âgées de 12 semaines (Charles River, France). Les femelles arrivent à l'animalerie le lendemain de l'accouplement (stade E1) et sont réparties une par cage. Elles sont pesées à leur arrivée, puis une fois par semaine. Les femelles ont un libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture. Elles sont soumises à un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h (éclairage de 8 heures à 20 heures). L'hygrométrie est stable et la température est maintenue à $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ dans les pièces d'hébergement.

Les femelles gestantes sont exposées à l'uranium appauvri dès leur arrivée par ingestion d'eau de boisson contaminée, c'est-à-dire au stade embryonnaire 1 jour (E1). Elles sont réparties en 3 groupes de contamination : un groupe témoin (Evian), un groupe contaminé à l'uranium appauvri 40 mg/L et un groupe contaminé à 120 mg/L (figure 22). Au total, 120 femelles ont été contaminées. Ce nombre a été calculé en fonction du nombre d'embryons, de fœtus, de ratons et de rats nécessaire pour les expériences. Cinq stades de développement (1 stade embryonnaire, 1 stade fœtal et 3 stades postnatals) et à un stade à l'âge adulte ont été étudiés :

- les embryons et les fœtus sont exposés à l'uranium pendant les 13 (stade E13) et 18 (stade E18) premiers jours prénatals. Les nouveaux nés sont exposés à l'uranium jusqu'à la naissance (stade P0). Les animaux sont donc exposés à l'uranium pendant la gestation ;
- aux stades postnatals, les ratons sont exposés à l'uranium pendant la gestation puis par le lait maternel jusqu'à 5 (stade P5) et 21 (stade P21) jours après la naissance ;

- au stade adulte, les rats sont exposés à l'uranium pendant la gestation, la lactation et par ingestion d'eau de boisson jusqu'à l'âge de 2 mois (stade 2 mois).

Le stade E13 correspond au pic de formation des cellules Cajal-Retzius qui sont les premiers neurones du cortex à être générés. Au stade E18, les couches cellulaires du néocortex apparaissent et les neurones de la région hippocampique commencent à se former. À la naissance (P0), les cinq couches du néocortex sont formées. Les cellules granulaires du gyrus denté naissent pendant la première semaine postnatale, c'est pourquoi nous avons étudié le stade P5. Au stade P21, l'ensemble des structures du néocortex et de l'hippocampe sont formées. C'est un stade de transition entre le développement et le stade adulte. Le stade 2 mois correspond à un stade adulte jeune où le processus de neurogenèse est encore actif au niveau du gyrus denté de l'hippocampe.

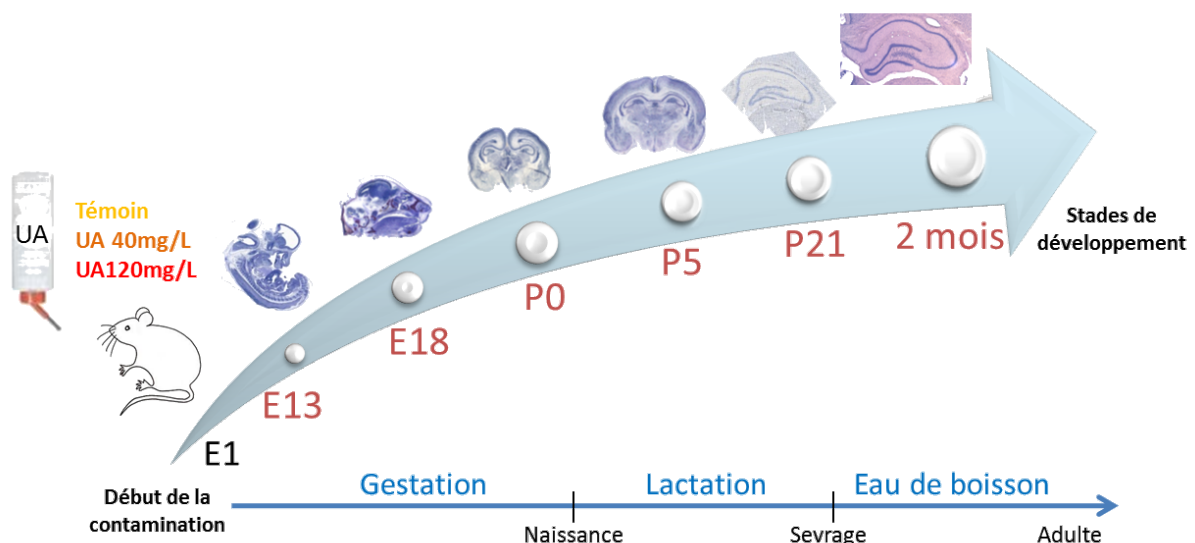


FIGURE 22 – Protocole de contamination des animaux

À ces différents stades, nous avons réalisé des études :

- histologiques, par coloration au crésyl violet ;
- de prolifération cellulaire, par marquage au BrdU ;
- de mort cellulaire, par expression génique des principaux gènes impliqués dans le processus d'apoptose par la technique Fluorojade et par immunohistochimie de la Caspase 3 activée ;
- de différenciation neuronale, par expression génique (RT-PCR) et par hybridation *in situ* de gènes impliqués dans le processus de différenciation neuronale et par immunohistochimie des marqueurs nestine, NeuN (neuronal nuclei) et doublecortine.

En parallèle de ces analyses que j'ai réalisées au cours de ma thèse, une étude a été menée au sein du laboratoire sur les animaux âgés de 21 jours et 2 mois. Une série de tests comportementaux classiques a été choisie dans un premier temps afin d'explorer de potentiels changements comporte-

mentaux (activités locomotrices et exploratoires, mémoire à court terme et dépression) chez les animaux contaminés à l'uranium.

L'activité locomotrice a été mesurée dans un actimètre (37 x 24 x 22 cm) équipé de deux rangées d'émetteurs à rayons infra-rouges situés à 5 et 9 cm de hauteur, mesurant les mouvements horizontaux et verticaux des animaux. L'actimètre permet de mesurer toutes les minutes, et ce pendant 20 min, les déplacements, ainsi que les redressements effectués par les animaux. L'activité exploratoire est étudiée par la mesure du nombre total de redressements (animal positionné sur ses deux pattes postérieures, droit, en équilibre dans le vide ou contre une paroi). L'activité locomotrice est étudiée par la mesure du nombre de mouvements horizontaux. L'actimètre est relié à un système informatisé qui compte le nombre de « coups », c'est-à-dire le nombre de fois où les faisceaux infra-rouges sont interrompus.

La mémoire à court terme est mesurée dans un labyrinthe en Y composé de trois branches identiques (13 x 4.5 x 5.5) disposées selon les médianes d'un triangle équilatéral. Les branches sont recouvertes de motifs distincts (ronds, triangles ou carrés). Les animaux sont placés dans le labyrinthe pendant 10 minutes, durant lesquelles sont répertoriées les branches visitées les unes après les autres. Un pourcentage d'alternances est calculé : $100 \times \text{nombre d'alternances positives} / \text{nombre d'alternances possibles}$.

Le test de la nage forcée a été utilisé pour donner une indication sur le comportement de résignation des animaux, une composante de l'humeur dépressif. Les animaux sont placés dans un bécher (40 cm de diamètre) rempli d'eau à $25 \pm 0,5$ °C pendant les 10 minutes. Les 5 premières minutes permettent l'habituation des animaux dans l'eau. Pendant les 5 dernières minutes, le temps d'immobilité des animaux, représentant le temps de résignation, est compté.

La répartition des animaux pour l'ensemble des expérimentations est résumée dans le tableau 3.

Les études expérimentales réalisées sur les animaux sont en accord avec les réglementations française (ministère de l'agriculture Act No. 2001-464, Mai 2001) et européenne (Décret 86/609/EEC) imposant l'obtention d'une autorisation d'expérimenter sur les animaux vivants ainsi qu'avec le comité d'éthique de l'IRSN.

Les protocoles de l'ensemble des expériences seront décrits dans les articles de la partie résultats. Dans cette partie, seront détaillés uniquement les protocoles utilisés qui n'ont pas fait l'objet de publication.

Stade	Femelles gestantes		Embryons, fœtus, ratons ou rats adultes				
	Total	Mesure d'UA (rein)	Total	Mesure d'UA	Études immunohisto-chimiques	Expression génique (PCR)	Comportement
E13	21	21	87	36 têtes et 12 embryons	15	15	
E18	18	18	104	48 têtes et 17 fœtus	15	24	
P0	15	15	87	24 (cerveaux et corps)	15	24	
P5	15	15	87	24 (cerveaux et corps)	15	24	
P21	24	24	96	24 (cerveaux et rein)	15	24	48
2 mois	27	27	96	24 (cerveaux et rein)	15	24	48

TABLEAU 3 – Répartition des groupes d'animaux pour les expérimentations

Pour chaque stade, le nombre indiqué correspond à la somme des animaux témoins, contaminés à 40 et à 120 mg/L, chaque groupe de contamination contenant le même nombre d'animaux.

2.2 Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-PCR)

La « *Polymerase Chain Reaction* » (PCR) semi-quantitative en temps réel utilisée permet l'amplification d'une faible quantité de fragments d'acides nucléiques afin de déterminer leur expression génique.

Dans une plaque 384 puits, 4 µL d'acide désoxyribo-nucléique complémentaire (ADNc) préalablement dilués au 1/50^e (1 ng/µL) et 6 µL d'un mélange réactionnel sont déposés dans chaque puits (10 µL). Ce dernier est composé d'eau stérile (14,5 %), des amorces sens et anti-sens (Invitrogen, 2,5 %) et de Power SYBR® Green Master Mix (Life Science, 83 %). Le SYBR® Green Master Mix s'incorpore de façon non spécifique dans un double brin d'ADN et émet une fluorescence à 530 nm. L'amplification est réalisée *via* un système de détection QuantStudio 12K Flex (Life Technologies). Les gènes de référence : la β2-microglobuline (β2MG), l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HPRT) et la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) permettent de normaliser l'expression des gènes cibles (tableau 4).

La quantification des ARNm se fait par la méthode de comparaison des C_T , c'est-à-dire le nombre de cycles permettant d'avoir un signal de fluorescence statistiquement supérieur au bruit de fond.

Gène	Forward	Reverse	Référence
Wnt3a	ATCTGCCACAAGAGCTTCCT	TCCAGGCAGAAGACAGTCAG	NM_001107005.2
Gap43	GTTTCCTCTCCTGTCCTGCT	CCACACGCACCAGATCAAAA	NM_017195.3
Notch1	AGCCTCGATTTTCCTGGTCA	AAGTTTCCAGCCTCCTCCTC	NM_001105721.1
Mash1	TCCCGCTTCCTTCTAGCTCT	CCTGCTTCCAAAGTCCATTC	NM_022384.1
NeuroD	CTCAGTTCTCAGGACGAGGA	TAGTTCTTGGCCAAGCGCAG	NM_010894.2
NeuroD2	TACTCTATGCACTACTCGGCGCT	GACAAAGGCCAAAGAAAAAGAGA	NM_019326.1
HPRT	GCTCGAGATGTCCATGAAGGAGA	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC	NM_012583.2
GAPDH	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	CATACTCAGCACCAGCATCACC	Hashemi <i>et al.</i> 2013
β 2MG	ACATCCTGGCTCACACTGAA	ATGTCTCGGTCCCAGGTG	Cook <i>et al.</i> 2009

TABLEAU 4 – Séquences des primers utilisés pour la RT-PCR

Wnt3a (Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3A), Gap43 (Growth Associated Protein 43), Notch1 (Notch homolog 1, translocation-associated), Mash1 (Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1), NeuroD (neuronal differentiation 1), NeuroD2 (neuronal differentiation 2), HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase), GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), β 2MG (β 2 microglobulin)

Sa valeur est inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc obtenue. La méthode analytique utilisée tient également compte de l'efficacité $E = 1 + \frac{Eff}{100}$ de chaque couple de primer.

Plusieurs étapes restrictives sont mises en place : les $C_T > 35$ et les duplicatas avec une différence intra-échantillon $> 0,5$ sont éliminés. De même, la stabilité des gènes de référence est vérifiée à travers le calcul de la moyenne de $E^{\Delta C_T}$, à partir de laquelle sont calculés l'écart-type standard (SD) et le coefficient de variation.

Les quantités relatives sont obtenues en calculant la moyenne des C_T par échantillon et pour chaque gène de référence et d'intérêt (« *target* ») dans le groupe témoin. Les ΔC_T sont ensuite calculés :

$$\Delta C_T \text{ target}(M C_T \text{ target témoin} - C_T \text{ target échantillon})$$

$$\Delta C_T \text{ réf}(M C_T \text{ réf témoin} - C_T \text{ réf échantillon})$$

Pour chaque échantillon et chaque gène, le $E^{\Delta C_T}$ est calculé, de même que l'efficacité moyenne des gènes de référence dans chaque échantillon : $\overline{M} \text{ géo} E \text{ réf}$.

Pour chaque groupe, les RQ et leur \log_{10} , le RQ_{\min} et le RQ_{\max} sont calculés.

$$RQ = \frac{(E \text{ target})^{\Delta C_T \text{ target(témoin - échantillon)}}}{(\overline{M} \text{ géo} E \text{ réf})^{\Delta C_T \text{ réf(témoin - échantillon)}}$$

$$RQ_{\min} = \overline{M} \log_{10}(RQ) - SD$$

$$RQ_{\max} = \overline{M} \log_{10}(RQ) + SD$$

Les données sont finalement retransformées en fonction linéaire en élevant chaque valeur à 10^X . Cette étape permet d'obtenir un SD asymétrique, ce qui est en adéquation avec la non-linéarité des données de qPCR.

$$SD_{upper} = 10^{RQ_{max}} - 10^{moyRQ}$$

$$SD_{lower} = 10^{moyRQ} - 10^{RQ_{min}}$$

Les tests de normalité sont appliqués sur les moyennes des CT, les tests statistiques sur les $\log_{10}(RQ)$ et la représentation graphique est obtenue à partir des valeurs de 10^{moyRQ} , SD_{upper} et SD_{lower} .

2.3 Expérimentation à l'âge adulte

2.3.1 Réalisation des coupes

Des coupes flottantes transversales de cerveaux de rats de 40 μm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (température à -20°C). La coupe est plongée dans trois bains successifs de PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, Invitrogen) afin de supprimer les résidus d'OCT (optimal cutting temperature), puis placée séquentiellement dans un tube eppendorf de 1,5 mL contenant une solution de cryoprotection (300 mL de PBS 1X, éthylène glycol 30 %, sucrose 30 %) et stocké à -20°C .

2.3.2 Marquages immunohistochimiques

2.3.2.1 Double-marquage Bromodéoxyuridine (BrdU) - Neuronal Nuclei (NeuN)

Le BrdU a été injecté chez les animaux par voie intrapéritonéale à une dose de 50 mg/kg, 24 et 48 heures avant l'euthanasie.

Un double marquage avec un anticorps anti-NeuN (Neuronal Nuclei) a été réalisé pour marquer de façon spécifique les neurones matures. Il permet ainsi de visualiser la différenciation des cellules nouvellement générées (BrdU positives) en neurones ainsi que l'ensemble des neurones matures présents dans l'hippocampe.

Après rinçage dans du PBS 1X, les coupes sont placées à 37°C dans une solution de trypsine 0,1 % - CaCl_2 0,1 % (Sigma Aldrich) permettant la perméabilisation membranaire. Elles sont ensuite incubées dans l'HCL 2M (VWR) à 37°C permettant la dénaturation de l'ADN puis dans un tampon

borate à pH 8,4 (55 mL d'acide borique 0,2M et 45 mL de sodium tetraborate à 0,05M (Sigma Aldrich)). Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-BrdU (Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine, Dako) dilué au 1/50^e dans du PBS 1X – Triton 0,3 % – Régilait 2 % : 30 minutes à température ambiante puis toute la nuit à 4°C. Après rinçage dans du PBS 1X, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la Cyanine 3 (Cy3 Donkey anti-mouse, Jackson Immunoresearch) dilué au 1/200^e dans du PBS 1X – Triton 0,3 % – Régilait 2 % pendant 2 heures à température ambiante à l'obscurité. Après rinçage dans du PBS 1X, les coupes sont incubées avec l'anticorps anti-NeuN directement couplé à l'Alexa 488 (Ms X Neuronal Nucléi, Alexa Fluor® 488, Millipore) dilué au 1/1000^e dans du PBS 1X – Triton 0,3 % – Régilait 2 % : 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Les coupes sont rincées dans du PBS 1X et sont montées sur des lames SuperFrost avec le milieu PROLONG® Gold antifade reagent (Life Technologies).

2.3.2.2 Double-marquage Doublecortine (DCX) - Neuronal Nuclei (NeuN)

Les coupes sont préincubées dans une solution PBS 1X Triton 0,3 % et protéines de lait 2 % à température ambiante puis sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dilués dans une solution de PBS 1X – Triton 0,3 % – Régilait 2 % toute la nuit à 4°C : Anti-NeuN dilué au 1/10 000^e (Mouse X Neuronal Nuclei, Millipore) et Anti-DCX dilué au 1/2000^e (Doublecortin Rabbit AB, Cell Signaling). Après rinçage dans du PBS 1X, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X – Triton 0,3 % – Régilait 2 % pendant 1 heure à l'obscurité : pour la détection de NeuN : Anti-IgG de souris couplé à la Cyanine 3 dilué au 1/200^e (Cy3 Donkey anti-mouse, Jackson Immunoresearch), pour la détection de la DCX : Anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 dilué au 1/400^e (Donkey Anti- Rabbit Alexa Fluor 488 IgG, Life Technologies). Trois rinçages dans le PBS 1X sont effectués puis les coupes sont montées sur des lames Superfrost avec le milieu PROLONG®.

2.4 Analyses statistiques

Tous les résultats obtenus sont présentés sous la forme moyenne \pm écart-type standard (SD). Pour toutes les analyses, la distribution normale des données a été vérifiée et les comparaisons entre les groupes ont été effectuées par l'analyse de la variance (test ANOVA à un facteur). Les différences sont considérées comme significatives si $p < 0,05$. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Sigmaplot 11 (Systat, Paris).

3 Résultats

Les résultats obtenus pendant ma thèse s'articuleront en trois parties. La première partie visera à déterminer si l'uranium s'accumule dans les tissus et s'il affecte l'état général des animaux. La deuxième partie visera à déterminer si une contamination chronique à l'uranium dès le stade *in utero* entraîne des perturbations de la neurogenèse et plus particulièrement de la morphologie structurale du cerveau, des processus de mort, de prolifération cellulaire et de différenciation neuronale à différents stades de développement pré et postnatal. Dans la dernière partie, nous nous intéresserons aux effets de l'uranium sur les processus de neurogenèse à l'âge adulte suite à une contamination débutant dès le stade *in utero*.

3.1 Suivi des animaux et des concentrations d'uranium

3.1.1 Suivi des consommations hydrique et alimentaire des animaux

Les consommations hydrique et alimentaire des femelles gestantes et des rats adultes ont été surveillées de façon hebdomadaire pendant toute la durée de l'expérimentation et sont résumées dans les tableaux 5A et B.

A - Consommation hydrique (ml)						
	E13	E18	P0	P5	P21	2 mois
Témoin	361±70	510±81	702±76	857±106	806±165	816±63
UA40	335±24	479±59	615±45	885±37	843±102	823±99
UA120	356±14	535±44	741±45	913±101	825±107	838±99

B - Consommation alimentaire (g)						
	E13	E18	P0	P5	P21	2 mois
Témoin	349±53	468±33	611±62	789±54	574±79	599±44
UA40	350±20	505±62	591±29	822±45	608±65	602±52
UA120	356±20	493±38	644±48	804±108	593±57	615±49

TABLEAU 5 – Consommations hydrique et alimentaire

Consommations hydrique en millilitre (A) et alimentaire en grammes (B) des femelles gestantes et allaitantes pour les stades E13, E18, P0, P5, P21 et des rats adultes 2 mois sur toute la durée de l'expérience. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne ± écart type.

L'analyse statistique par le test Anova one way n'a pas révélé de différence dans les consommations hydriques et alimentaires des femelles gestantes et des rats âgés de deux mois exposés à l'uranium par rapport aux animaux témoins.

3.1.2 Suivi du poids des animaux

Les poids des femelles gestantes à tous les stades étudiés est similaire entre les groupes témoins et exposés à l'uranium (tableau 6A). Les poids des embryons E13 et des fœtus E18 ne sont pas modifiés suite à l'exposition à l'uranium. Les résultats montrent une diminution du poids des nouveau-nés exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L par rapport aux animaux témoins. Au contraire, une augmentation du poids des ratons P5 exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L et aussi des ratons P21 exposés à l'uranium à 120 mg/L a été observée. Enfin, les rats âgés de 2 mois exposés à l'uranium ont un poids similaire aux rats témoins (tableau 6B).

A - Poids des femelles gestantes et allaitantes (g)						
	E13	E18	P0	P5	P21	2 mois
Témoin	295,0±24,5	355,8±16,1	300,0±16,4	330,0±28,8	333,1±16,4	328,1±17,3
UA40	290,3±5,3	361,5±43,3	304,2±10,2	329,4±9,4	353,0±18,2	325,4±21,2
UA120	341,5±8,3	347,5±10,7	316,8±14,4	318,0±15,6	348,0±13,2	329,7±17,2

B - Poids embryons, fœtus, ratons et rats (g)						
	E13	E18	P0	P5	P21	2 mois
Témoin	0,295±0,005	1,414±0,126	7,026±0,404	9,686±1,195	41,723±5,402	336±31
UA40	0,293±0,008	1,709±0,217	6,482±0,412*	11,132±1,003*	38,820±5,460	343±30
UA120	0,198±0,030	1,659±0,071	6,633±0,262*	10,632±1,136*	50,330±4,208*	352±40

TABLEAU 6 – Poids des animaux

A : Poids des femelles gestantes et allaitantes aux stades E13, E18, P0, P5, P21 et 2 mois (au stade 2 mois, les femelles ont été sacrifiées au sevrage des animaux). B : Poids des embryons E13, des fœtus E18, des ratons P0, P5 et P21 et des rats adultes 2 mois. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne ± écart type. L'analyse statistique a été réalisée par le test Anova one way et les résultats sont significatifs si $p < 0,05$.

3.1.3 Concentration d'uranium dans les tissus

Les mesures des quantités d'uranium dans les tissus ont été réalisées par ICP-MS (induced coupled plasma-masse spectrometry).

Les concentrations d'uranium dans les reins des femelles exposées à l'uranium sont significativement supérieures à celles retrouvées dans les reins des femelles témoins à tous les stades étudiés (tableau 7A). Les résultats n'ont pas montré d'accumulation d'uranium dans les embryons et les fœ-

tus exposés par rapport aux témoins. En revanche, la quantité d'uranium dans les corps des rats P0, P5 et dans les reins des rats P21 et 2 mois est significativement supérieure par rapport à celle retrouvée dans les animaux témoins (tableau 7B).

A - Concentration d'uranium dans les reins des femelles gestantes et allaitantes (ng/g)			
	E13	E18	P0
Témoin	1,80±1,06	2,45±0,53	3,68±0,99
UA40	34,47±14,81***	76,39±38,99***	68,77±32,39***
UA120	226,11±148,08***	152,90±51,72***	378,55±147,49***
	P5	P21	2 mois
Témoin	4,32±2,17	5,25±1,08	5,11±2,13
UA40	124,47±44,39***	142,29±57,50***	167,16±41,87***
UA120	555,07±157,32***	1722,16±577,74***	641,02±170,77***

B - Concentration d'uranium dans les embryons, fœtus, rats et reins des rats (ng/g)						
	E13	E18	P0	P5	P21	2 mois
Témoin	0,53±0,15	0,22±0,08	0,15±0,05	1,33±0,79	3,42±0,89	6,45±2,14
UA40	1,41±0,90	0,19±0,02	2,87±2,69*	10,33±4,43*	46,90±30,03*	193,32±61,65*
UA120	1,61±0,97	0,35±0,07	3,43±1,53*	16,76±5,32*	282,54±121,56*	584,54±207,25*

TABLEAU 7 – Tableau récapitulatif des concentrations d'uranium dans les tissus

A : Concentration d'uranium (ng/g de tissus) dans les reins des femelles gestantes et allaitantes témoins et exposées à l'uranium appauvri à 40 et à 120 mg/L (au stade 2 mois, les femelles ont été sacrifiées au sevrage des animaux). B : Concentrations d'uranium (ng/g de tissus) dans les embryons, les fœtus, les corps des rats P0 et P5 et dans les reins des rats P21 et 2 mois. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart type. L'analyse statistique a été réalisée par le test Anova one way et les résultats sont significatifs si *p<0,05, ***p<0,001.

La quantité d'uranium a également été mesurée dans les têtes des embryons, fœtus et dans les cerveaux des rats P0, P5, P21 et 2 mois. Jusqu'au stade P21, nos analyses n'ont pas mis en évidence d'uranium dans les têtes et dans les cerveaux des animaux. En revanche, au stade 2 mois, une augmentation de la quantité d'uranium est observée dans les cerveaux des rats exposés à l'uranium 120 mg/L (témoin : 0,08±0,05 ng/g, UA40 : 0,51±0,90 ng/g, UA120 : 0,67±0,36 ng/g, p<0,001).

3.2 Perturbation de la neurogenèse au cours du développement chez des animaux exposés à l'uranium dès le stade *in utero*

3.2.1 Modifications dans les processus de prolifération et de mort cellulaire aux stades prénatals et postnatals

L'objectif de cette première étude était de mettre en évidence les effets d'une exposition à l'uranium dès le stade *in utero* sur la morphologie structurale du cerveau et sur les processus de mort et de prolifération cellulaire aux stades prénatals E13, E18 et aux stades postnatals P0, P5 et P21. La morphologie structurale du cerveau et plus particulièrement du télencéphale aux stades prénatals et de l'hippocampe aux stades postnatals a été étudiée par coloration au crésyl violet. Le processus de mort cellulaire a été étudié par immunohistochimie de la caspase-3 activée et par la technique fluorojade. Enfin, le processus de prolifération cellulaire a été analysé par incorporation du BrdU.

Nos résultats ont mis en évidence une diminution du nombre de cellules marquées au fluorojade dans le neuroépithélium cortical des embryons E13 exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L (NC : témoin= $3,70 \pm 1,60 \times 10^{-2}$ mm², UA40= $2,40 \pm 0,50 \times 10^{-2}$ mm², UA120= $1,78 \pm 0,58 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0,01$). Au stade E18, nos résultats montrent également une diminution du nombre de cellules marquées au fluorojade dans le neuroépithélium cortical des fœtus E18 exposés à l'uranium à 120 mg/L (NC : témoin= $3,39 \pm 1,11 \times 10^{-2}$ mm², UA40= $4,81 \pm 1,72 \times 10^{-2}$ mm², UA120= $1,96 \pm 1,54 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0,05$). Aucune modification dans le nombre de cellules marquées à la caspase-3 n'a été observée aux stades prénatals. De plus, une augmentation du marquage BrdU dans le neuroépithélium denté des fœtus E18 exposés à 120 mg/L a été observée (témoin= $0,51 \pm 0,41 \times 10^{-2}$ mm², UA40= $0,82 \pm 0,31 \times 10^{-2}$ mm², UA120= $1,77 \pm 0,63 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0,01$), mais aucune modification n'a été observée dans le neuroépithélium des embryons E13.

Aux stades postnatals, une augmentation du nombre de cellules marquées au fluorojade est observée dans le gyrus denté des rats P0 et P5 exposés à 120 mg/L (P0 : témoin= $1,21 \pm 0,15 \times 10^{-2}$ mm², UA40= $1,31 \pm 0,15 \times 10^{-2}$ mm², DU120= $2,01 \pm 0,28 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0,01$ et P5 : témoin= $2,24 \pm 0,54 \times 10^{-2}$ mm², UA40= $2,64 \pm 0,87 \times 10^{-2}$ mm², UA120= $3,99 \pm 1,04 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0,05$). Cette augmentation est associée à une augmentation du nombre de cellules marquées à la caspase-3 uniquement au stade P5 (GD : témoin : $0,59 \pm 0,85 \times 10^{-3}$ mm², UA40= $1,13 \pm 0,90 \times 10^{-3}$ mm², UA120= $2,96 \pm 1,87 \times 10^{-3}$ mm², $p < 0,05$). Au stade P21, aucune modification n'a été observée sur le processus de mort cellulaire. Enfin, une diminution du nombre de cellules ayant incorporées le BrdU est observée dans le gyrus denté des rats P21 exposés à 120 mg/L d'uranium (DG : témoin= $3,62 \pm 1,47$, UA40= $2,54 \pm 0,71$, UA120= $1,85 \pm 0,45$, $p < 0,05$), mais aucune modification n'est mise en évidence au niveau du gyrus denté des rats P0 et P5.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'exposition à l'uranium pendant le développement cérébral entraîne des modifications dans les processus de neurogenèse, principalement à la plus forte concentration d'uranium. Ces modifications semblent opposées entre les stades prénatals et postnatals. En effet, l'exposition à l'uranium augmente la prolifération cellulaire dans le neuroépithélium denté des fœtus et diminue le processus de mort cellulaire des embryons et des fœtus au cours du développement prénatal. Au stade postnatal, l'uranium entraîne une diminution de la prolifération cellulaire dans le gyrus denté des rats P21 et une augmentation de la mort cellulaire dans le gyrus denté des rats P0 et P5. Bien que ces modifications n'entraînent pas de modification morphologique majeure dans le développement des structures cérébrales, elles peuvent avoir un impact sur les autres étapes de la neurogenèse, notamment sur la différenciation neuronale et la migration qui a fait l'objet d'une analyse particulière (cf. 3.2.2).

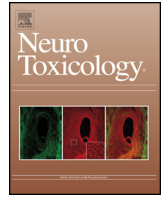
Cell proliferation and cell death are disturbed during prenatal and postnatal brain development after uranium exposure (2016, Neurotoxicology).

Legrand M, Elie C, Stefani J, Florès N, Culeux C, Delissen O, Ibanez C, Lestaevel P, Eriksson P, Dinocourt C.



Contents lists available at ScienceDirect

NeuroToxicology



Full length article

Cell proliferation and cell death are disturbed during prenatal and postnatal brain development after uranium exposure



M. Legrand^a, C. Elie^a, J. Stefani^a, N. Florès^a, C. Culeux^a, O. Delissen^a, C. Ibanez^a, P. Lestaevel^a, P. Eriksson^b, C. Dinocourt^{a,*}

^a Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, B.P. 17, 92262 Fontenay aux Roses Cedex, France

^b Department of Environmental Toxicology, Uppsala University, Norbyvägen 18 A, 752 36 Uppsala, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2015

Received in revised form 13 October 2015

Accepted 13 October 2015

Available online 23 October 2015

Keywords:

Neurogenesis
Heavy metal
Brain development
Telencephalon
Dentate gyrus

ABSTRACT

The developing brain is more susceptible to neurotoxic compounds than adult brain. It is also well known that disturbances during brain development cause neurological disorders in adulthood. The brain is known to be a target organ of uranium (U) exposure and previous studies have noted that internal U contamination of adult rats induces behavioral disorders as well as affects neurochemistry and neurophysiological properties. In this study, we investigated whether depleted uranium (DU) exposure affects neurogenesis during prenatal and postnatal brain development. We examined the structural morphology of the brain, cell death and finally cell proliferation in animals exposed to DU during gestation and lactation compared to control animals. Our results showed that DU decreases cell death in the cortical neuroepithelium of gestational day (GD) 13 embryos exposed at 40 mg/L and 120 mg/L and of GD18 fetuses exposed at 120 mg/L without modification of the number of apoptotic cells. Cell proliferation analysis showed an increase of BrdU labeling in the dentate neuroepithelium of fetuses from GD18 at 120 mg/L. Postnatally, cell death is increased in the dentate gyrus of postnatal day (PND) 0 and PND5 exposed pups at 120 mg/L and is associated with an increase of apoptotic cell number only at PND5. Finally, a decrease in dividing cells is observed in the dentate gyrus of PND21 rats developmentally exposed to 120 mg/L DU, but not at PND0 and PND5. These results show that DU exposure during brain development causes opposite effects on cell proliferation and cell death processes between prenatal and postnatal development mainly at the highest dose. Although these modifications do not have a major impact in brain morphology, they could affect the next steps of neurogenesis and thus might disrupt the fine organization of the neuronal network.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

During development, the brain is sensitive to injury from neurotoxic agents (Rice and Barone, 2000). Developmental exposure to heavy metals can interfere with the processes of neurogenesis that lead to neuron generation during central nervous system formation: cell proliferation, migration, differentiation, synaptogenesis and cell death (Gotz and Huttner, 2005).

Uranium (U) is a heavy metal naturally found in the environment. Civilian and military uses of U increase its concentration in the environment (Briner, 2010), and thus civilian populations can be chronically exposed to U by ingestion of contaminated food and water (ATSDR, 2013). Depleted uranium (DU) is a by-product of uranium enrichment for nuclear energy or weapons. It is an emerging environmental pollutant and has the same chemical toxicity as natural uranium, but is 40% less radioactive. Although DU accumulates more in the kidneys and bones, the brain is also a target organ (Lestaevel et al., 2005b). After chronic ingestion, U found in the brain of adult rats was heterogeneously distributed in the cortex, striatum and hippocampus (Paquet et al., 2006). U may be able to cross the blood-brain barrier by vascular transfer (Lemerrier et al., 2003), but the precise mechanism of this transfer is not clearly demonstrated.

Epidemiologic studies show that cognitive impairment increases in populations exposed to U (Howland, 1948; McDiarmid

* Corresponding author. Present address: IRSN, Direction de la Stratégie du Développement et des Partenariats, Service Programmes et Stratégies scientifiques. Tel.: +33 1 58 35 91 83; fax: +33 1 58 35 84 67.

E-mail addresses: marie.legrand@irsn.fr (M. Legrand), christelle.elie@irsn.fr (C. Elie), johanna.stefani@irsn.fr (J. Stefani), nicole.flores@irsn.fr (N. Florès), cecile.culeux@gmail.com (C. Culeux), olivia.delissen@irsn.fr (O. Delissen), christelle.ibanez@irsn.fr (C. Ibanez), philippe.lesaavel@irsn.fr (P. Lestaavel), per.eriksson@ebc.uu.se (P. Eriksson), celine.dinocourt@irsn.fr (C. Dinocourt).

et al., 2002). Experimental studies on adult rats have demonstrated that DU exposure by ingestion impairs cognitive functions. Subchronic and chronic exposure to DU induced an increase of paradoxical sleep (Lestaevel et al., 2005a), a reduction in spatial memory capacities, an increase in anxiety and a decrease of locomotor activity (Briner and Davis, 2002; Briner and Murray, 2005; Houpert et al., 2005).

Several mechanisms by which DU would be able to cause neurotoxicity and alter behavior have been explored. Alterations of the cholinergic system as well as of dopaminergic and serotonergic metabolism (Bensoussan et al., 2009; Bussy et al., 2006) and disturbance of pro-/anti oxidant balance have been described after chronic ingestion of DU (Briner and Murray, 2005; Lestaevel et al., 2009).

Little is known about the toxicity of U on the brain during its development. Most data on the perinatal and postnatal effects of DU in rodents have focused on developmental toxicity and fetal development effects (Domingo, 2001; Paternain et al., 1989). Briner and Abboud (2002) showed that mice exposed to DU during gestation and lactation exposed mothers *via* drinking water had a decrease of locomotor activity at the age of 3 weeks than controls. Parental exposure to enriched uranium as well as during gestation and lactation showed changes in postnatal development and decreased spatial working memory of the offspring (Houpert et al., 2007). In contrast, Sanchez et al. (2006) did not observe any disorders in spatial learning after exposure to natural uranium. Recent studies showed that DU exposure from birth to 10 weeks causes impairment of object recognition memory associated with a decrease of acetylcholine concentration and acetylcholinesterase activity (Lestaevel et al., 2013). In these exposed animals, a decrease of locomotor activity and a disturbance of anxiety with an increase of oxidative stress were also described (Lestaevel et al., 2015). Thus, possible effects of U on neurobehavior and mechanisms underlying these effects during the sensitive early life stages of rats are insufficiently explored.

By its chemical properties, DU toxicity can be likened to heavy metal toxicity, of lead or cadmium, for example. It is well known that chronic exposure to heavy metal present in the environment during pregnancy and in infancy is associated with a risk of impaired cognitive development and behavioral alterations (Liu and Lewis, 2014). The mechanisms by which heavy metals alter behavior remain to be determined, but neurogenesis may be involved (Chow et al., 2008; Dou and Zhang, 2011; Liu and Lewis, 2014).

Likewise, DU might impair cognitive functions by acting on neurogenesis. Therefore, the aim of our study was to determine if DU exposure disturbs neurogenesis during brain development in rats. Morphogenesis, cell proliferation and cell death were studied at the prenatal, neonatal and postnatal stages. We focused on the telencephalon during embryonic and fetal brain development since it will give rise to the future cortex and hippocampus, which are involved in cognitive functions. In pups and young rats, we focused on the dentate gyrus (DG), which develops principally after birth and is one of the main neurogenic areas at the adult stage involved in synaptic plasticity and thus in cognitive functions (Ming and Song, 2005).

2. Material and methods

2.1. Animals and contamination protocol

Pregnant female Sprague–Dawley rats were received from Charles River (L'Arbresle, France) and used for the experiments. Pregnant females were housed alone under standard conditions with food and water provided *ad libitum* (light on: 8.00am/8.00pm, temperature: 22 °C ± 1 °C). Body weight, food and water

consumption were measured weekly. Pregnant females were exposed to DU (Areva-Cogema, France) *via* drinking water from the first day after mating (gestational day 1: GD1). The specific activity of DU is 14.103 Bq/g and its isotopic composition is 238U: 99.73%, 235U: 0.255%, 234U: 0.01%. Pregnant rats were divided into three groups: control group, 40 mg/L DU group and 120 mg/L DU group. These concentrations were chosen from previous studies (Houpert et al., 2005; Briner and Murray, 2005). Based on water consumption of 100 mL daily, rats were exposed to 2 or 6 mg/kg/day, respectively. These doses are approximately equal to 1/100 and 1/33 of acute oral LD50 of U in adult rats (Domingo et al., 1987). DU was dissolved in standardized mineral water. The animals of the control group drank mineral water of the same composition. The number of females was calculated with respect to the number of offspring needed for all experiments.

Pregnant females were divided in five time points during development: gestational day (GD) 13 (21 females), GD18 (18 females), postnatal day (PND) 0 (15 females), PND5 (15 females) and PND21 (18 females). Embryos, fetuses, neonatal and postnatal rats were taken for analysis as follows: 42 embryos from 21 litters at GD13, 33 fetuses from 17 litters at GD18, 30 male and female pups from 15 litters at PND0, 30 male and female pups from 15 litters at PND5 and 33 male pups from 18 litters at PND21.

All animal procedures were approved by the Animal Care Committee of IRSN and were conducted in accordance with French legislation and European legal requirements (Decree 86/609/EEC) concerning the protection of animals used for experimental purposes. Scientists certified by the French Ministry of Agriculture performed all procedures in animals.

2.2. Tissue collection and preparation

Pregnant rats were deeply anesthetized with isoflurane 5%/air 95% inhalation and sacrificed by exsanguination. Kidneys of pregnant females were removed in order to measure the concentration of U at each time point (GD13: $n = 12$; GD18: $n = 18$, PND0 and PND5: $n = 15$, PND21: $n = 18$). U concentrations were also measured in whole bodies of embryos from GD13 ($n = 12$), fetuses from GD18 ($n = 18$), in the bottom of the stomach, where the kidneys are localized, of pups from PND0 ($n = 24$) and PND5 ($n = 24$) and in kidneys from PND21 rats ($n = 24$). All samples were weighed and stored at –20 °C until assay by ICP–MS.

For histology and immunochemistry, embryos from GD13 and fetuses from GD18 were collected, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 1 h at room temperature (RT) and overnight at 4 °C. Brains of PND0 and PND5 pups were collected and fixed in the same way as embryos and fetuses. PND21 rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of 60 mg/kg sodium pentobarbital and were perfused transcardially with 4% PFA. Brains were removed and post-fixed for 1 h in 4% PFA at RT and overnight at 4 °C. All heads of embryos and fetuses and brains of rat pups were washed in PBS 1X solution and stored in a 30% sucrose solution at 4 °C. They were then embedded in Tissue-Tek OCT compound, frozen in a liquid nitrogen/isopentane mixture and kept at –80 °C until use. Embryos and heads of fetuses were sagittally sectioned and brains of pups were coronally sectioned with a cryostat at a thickness of 10 μm or 20 μm. Brain sections were collected on superfrost slides and stored at –80 °C until use.

2.3. Uranium concentration

Samples were prepared by adding 8 mL of ultrapure 67–69% nitric acid and 2 mL of hydrogen peroxide and then mineralizing them in a 1000 W microwave (Ethos Touch; Milestone Microwave Laboratory Systems; Italy) with a 20-min ramp to 180 °C and then 10 min at 180 °C. U content from mineralized samples was

determined with an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICPMS-QX7-serie 2, Thermoelectron, France) with bismuth ($1 \mu\text{g/L}$) as the internal standard. The ICP-MS limit of detection for U is $104 \mu\text{g/L}$. Values were expressed as ng U/g tissue.

2.4. Nissl staining

Brain sections were hydrated in alcohol of descending concentration (95–80–70%) and stained for 45 s in a cresyl violet solution. After a step of tissue differentiation in acetic formalin solution, sections were dehydrated in alcohol of ascending concentration (80–95–100%), fixed in xylene and then coverslipped with Permount (Fisher Scientific, New Jersey).

Nissl staining was used to determine the general histological characteristics of the brain, especially in the telencephalic region for prenatal stages and in the hippocampus for neonatal and postnatal stages. Nissl staining allowed us to choose similar levels of the brain to compare the control and exposed animal groups. Two levels of embryonic and fetal brains (lateral and median) were selected and we focused on the telencephalon area (cortical, hippocampal and dentate neuroepithelia). At the different neonatal and postnatal stages, 4 levels of the brain were selected and the DG of the hippocampus was analyzed. From each prenatal, neonatal and postnatal brain, adjacent sections were processed for: (1) BrdU immunohistochemistry; (2) neuronal cell death method (fluorochrome C) and (3) apoptosis detection (activated caspase-3). Brain sections from control and exposed animals were always processed in parallel.

2.5. BrdU injection and immunohistochemistry

In order to investigate the effect of DU on proliferation of progenitor cells, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France; 50 mg/kg prepared in sterile NaCl) was injected intraperitoneally into pregnant females on GD13 and GD18 or into rat pups at PND0, PND5 and PND21. Cell proliferation was examined 4 h after BrdU injection at all time points, except for PND21 rats that received two injections of BrdU at 48 and 24 h before sacrifice. For immunohistochemistry, brain sections were rehydrated in phosphate-buffer saline 1X (PBS) and were incubated in 0.1% trypsin-0.1% CaCl_2 diluted in distilled water for 20 min at 37°C . Slices were treated to denature the DNA in 2 M HCL for 30 min and were rinsed twice for 5 min in a borate buffer (55 mL of 0.2 M boric acid/45 mL 0.05 M sodium tetraborate, pH 8.4, Sigma Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France). Sections were rinsed three times in PBS and incubated in a primary mouse monoclonal anti-BrdU antibody (1:50, Dako, Trappes, France) in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBS-T) for 30 min at RT and overnight at 4°C . Slices were washed three times in PBS and incubated with cyanine 3-conjugated donkey anti-mouse diluted in PBS-T (1:200, Jackson ImmunoResearch, France) for 2 h at RT. Slides were then rinsed and mounted using Vectashield Dapi-containing medium (Vector Laboratories, Burlingame).

2.6. Fluorochrome staining

Based on the protocol described by Schmued (Schmued et al., 2005), brain sections were dried overnight at 50°C and immersed

in a solution containing 1% sodium hydroxide in 80% alcohol for 5 min. Quickly rehydrated, they were incubated in 0.06% potassium permanganate for 5 min. Slices were then rinsed in distilled water and transferred to 0.0004% fluorochrome C (Millipore, France) solution for 10 min. Finally, slices were washed in distilled water, dried at 50°C for several minutes, immersed in xylene and coverslipped with Permount (Fisher Scientific).

2.7. Cleaved caspase-3 immunohistochemistry

Brain sections were rehydrated in PBS and incubated for 1 h in a blocking solution containing 5% donkey serum in PBS-T at RT. Then they were incubated in an anti-cleaved caspase-3 antibody (1:200, Millipore, France) overnight at 4°C . Brain sections were washed in PBS 1X and incubated for 2 h at RT with alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit diluted in PBS-T (1:200, Jackson ImmunoResearch, France). Slices were finally washed and mounted using Vectashield Dapi-containing medium.

2.8. Microscopy and quantitative analyses

Nissl-stained slices were observed with a visible light optical microscope (Leica DM 4000B, Microvision, Evry, France) and slices stained for BrdU, fluorochrome C or cleaved caspase-3 detection were analyzed with a fluorescence microscope (Zeiss, Axiophot, Germany). Histolab software (Microvision Instruments, Evry, France) was used to analyze and quantify the staining.

Quantitative analyses were performed in cortical, hippocampal and dentate neuroepithelia of brains from embryos from GD13 and fetuses from GD18 and in the DG of hippocampus from PND0 and PND5. At PND21, analyses were focused on the granular cell layer of the DG.

From each developmental stage, DU-exposed animals were compared with controls. We measured the BrdU-stained area/ mm^2 on each structure in embryos GD13, fetuses GD18 and pups from PND0 and PND5. The density (number of BrdU-positive cells/ mm^2) in the granular cell layer of DG of PND21 rats was analyzed and compared between control and DU-exposed groups. The number of fluorochrome-positive cells and the number of cleaved caspase 3-positive cells/ mm^2 were quantified at all stages of DU exposure.

2.9. Statistical analyses

U concentrations in samples were compared between control and DU-exposed groups with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

Body weights of neonatal and postnatal rats are presented as mean \pm standard deviation (SD) in Table 1. One-way ANOVA followed by Dunn's method or the Holm-Sidak method was used to compare the body weights of the control and exposed groups.

Analyses were performed on 5 animals from different litters per group for histological staining and immunohistochemistry. All results are graphically presented as means \pm SD. One-way ANOVA followed by Dunn's method or the Holm-Sidak method was used to compare the control and exposed groups.

Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using Sigmaplot

Table 1
Uranium concentration in kidneys of animals.

	GD13	GD18	PND0	PND5	PND21
Control	1.80 ± 1.06	2.45 ± 0.53	3.68 ± 0.99	4.32 ± 2.17	5.25 ± 1.08
DU40	$34.47 \pm 14.81^{***}$	$76.39 \pm 38.99^{***}$	$68.77 \pm 32.39^{***}$	$124.47 \pm 44.39^{***}$	$142.29 \pm 57.50^{***}$
DU120	$226.11 \pm 148.08^{***}$	$152.90 \pm 51.72^{***}$	$378.55 \pm 147.49^{***}$	$555.07 \pm 157.32^{***}$	$1722.16 \pm 577.74^{***}$

Uranium concentration (ng/g of tissue) in kidneys of pregnant and nursing female rats for control group and groups exposed to 40 and 120 mg/L DU. Results are expressed as mean \pm SD and the level of significance was set at $^{***} p < 0.001$. DU: depleted uranium, GD: gestational day, PND: postnatal day.

software (Systat software Inc., San Jose, Ca) by using standard deviation (SD).

3. Results

3.1. General health parameters and uranium levels in exposed animals

Throughout the exposure period, drinking water and food consumption were measured weekly and were similar in the DU-exposed and control animals.

U concentrations in the kidneys of exposed pregnant and nursing female rats were significantly higher than in control females when measured on GD13, GD18, PND0, PND5 and PND21 (Table 1). U levels in bodies of embryos from GD13, fetuses from GD18, pups from PND0 and PND5 and in the kidneys of PND21 rats are shown in Fig. 1. No significant accumulation of U was observed in exposed embryos from GD13 and fetuses from GD18 compared with the control group. However, U concentrations in the bodies of pups from PND0 and PND5 and in the kidneys of PND21 rats were significantly higher in exposed rats to 40 and 120 mg/L DU than in control animals ($p < 0.001$) (Fig. 1).

The number of embryos, fetuses and new born pups was not modified after DU exposure. No change in body weight gains of pregnant females or of embryos from GD13 and fetuses from GD18 was observed after exposure to DU (data not shown). Body weights of neonatal and postnatal pups are summarized in Table 2. Analyses showed a significant decrease of body weight of newborn pups exposed to 40 and 120 mg/L DU compared with control animals. However, we observed a significant increase of body weight of PND5 pups exposed to 40 and 120 mg/L DU and an increase of body weight of PND21 male rats exposed to 120 mg/L DU compared with control groups.

3.2. Effects of DU on neurogenesis during prenatal brain development

3.2.1. Brain morphology

We first used Nissl staining to study cell morphology and histological patterns of the brain after DU exposure. No major modification of morphology of the brain structures was observed in embryos from GD13 or fetuses from GD18 exposed to DU compared with control animals. We then focused on specific areas

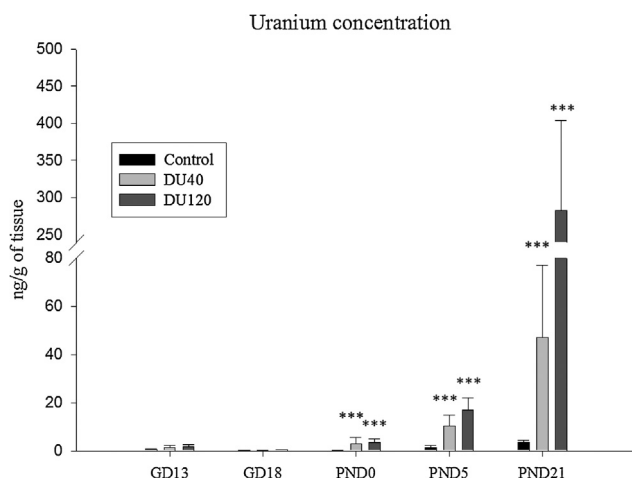


Fig. 1. Uranium concentration at prenatal and postnatal stages. Uranium concentration (ng/g of tissue) in embryos from GD13, fetuses from GD18, bodies of PND0 and PND5 pups and kidneys of PND21 rats in control and rats exposed to 40 and 120 mg/L DU. Asterisks indicate a significant difference between the exposed and control rats (one-way ANOVA, *** $p < 0.001$). GD: gestational day, PND: postnatal day, DU: depleted uranium.

Table 2
Body weight of animals.

Stages	Weight (g)		
	Control	DU40	DU120
PND0	7.026 ± 0.549	6.482 ± 0.553 [*]	6.633 ± 0.336 [*]
PND5	9.686 ± 1.563	11.132 ± 1.287 [*]	10.632 ± 1.736 [*]
PND21	41.723 ± 6.687	38.820 ± 6.670	50.330 ± 5.153 [*]

Body weight of pups and young adult rats at the end of the experiments. Results are expressed as mean ± SD for control animals and animals exposed to 40 and 120 mg/L DU. The level of significance was set at ^{*} $p < 0.05$. DU: Depleted uranium, PND: postnatal day.

of the telencephalon, and the cortical and hippocampal neuroepithelia of these embryos and fetuses and also the dentate neuroepithelium of fetuses. We compared lateral and medial levels of control and DU-exposed groups. In exposed embryos from GD13, the distribution and morphology of cell bodies in the cortical preplate (CPP), the sub-ventricular zone (SVZ) and the ventricular zone (VZ) of the cortical neuroepithelium were similar to those of control animals. Likewise, cell bodies in the intermediate zone (IZ), the SVZ and the VZ of the hippocampal neuroepithelium had a similar cell distribution and morphology in DU-exposed embryos and in control animals (Fig. 2A–C). No modification in the distribution and morphology of cell bodies was observed in exposed fetuses from GD18 in layer 1 (L1), the cortical plate (CP), cortical subplate (CSP), intermediate zone (IZ), SVZ or VZ of the cortical neuroepithelium, or in the intermediate zone (IZ), SVZ and VZ of the hippocampal and dentate neuroepithelia compared to control group (Fig. 3A–C).

3.2.2. Cell death process

Neural cell death and more specifically in cortical, hippocampal and dentate neuroepithelia were studied using fluorojade C staining to identify dying neurons and cleaved caspase 3 antibody to stain apoptotic cells. Cells labeled with fluorojade C were similarly distributed in the SVZ of the cortical and hippocampal neuroepithelia in DU-exposed embryos from GD13 compared with controls. However, quantitative analysis showed a significant decrease in the number of fluorojade-positive cells only in the cortical neuroepithelium at the medial level of the brain at 120 mg/L DU (CN: control = $3.70 \pm 1.60 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, DU40 = $2.40 \pm 0.50 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, DU120 = $1.78 \pm 0.58 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, $p < 0.01$) (Fig. 4A and B). Few cleaved caspase 3-positive cells with pyknotic nuclei were identified in the cortical and hippocampal neuroepithelia at GD13. In the lateral and medial levels of the brain, cleaved caspase 3-positive cells were located in the CPP and SVZ of the cortical neuroepithelium and in the IZ and SVZ of the hippocampal neuroepithelium. Distribution of cleaved caspase 3-positive cells was similar in the control and DU-exposed groups and no modification of their number was observed between control and exposed embryos (Fig. 4C and D).

Analysis of neuronal cell death in fetuses from GD18 showed that fluorojade-positive cells were observed in the CP and SVZ of the cortical neuroepithelium and in the IZ and SVZ of the hippocampal neuroepithelium. In fetuses exposed to 120 mg/L DU, the number of fluorojade-labeled cells tended to decrease in the cortical and hippocampal neuroepithelia, but quantitative analyses showed a significant decrease only at the lateral level of the cortical neuroepithelium at 120 mg/L DU (CN: control = $3.39 \pm 1.11 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, DU40 = $4.81 \pm 1.72 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, DU120 = $1.96 \pm 1.54 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, $p < 0.05$) (Fig. 4E and F). Like in the embryos, few cleaved caspase 3-positive cells with pyknotic nuclei were observed in the cortical and hippocampal neuroepithelia in the fetuses. Cleaved caspase 3-positive cells were located in the CPP

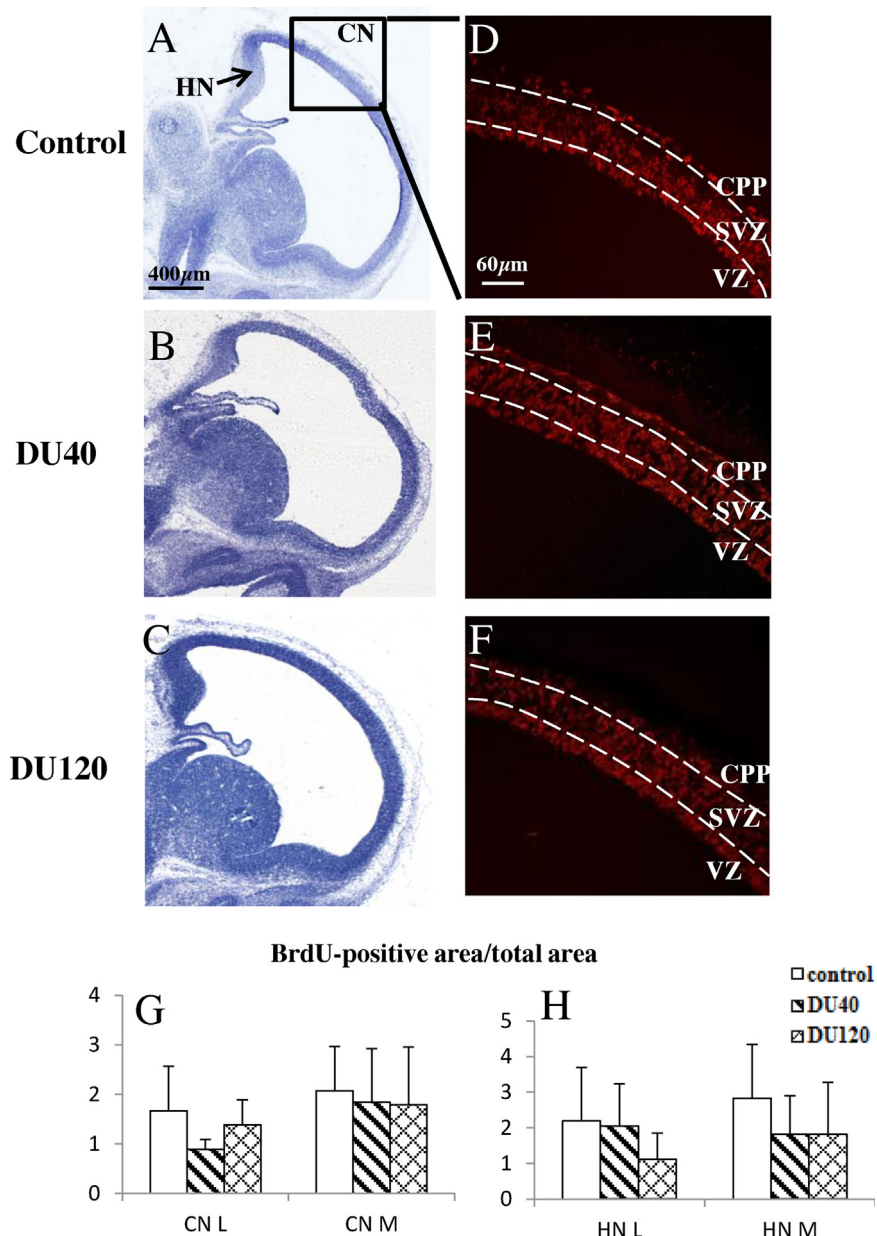


Fig. 2. Morphology and cell proliferation in embryos from gestational day 13. (A–C) Nissl staining of the telencephalon of control embryos and embryos exposed to 40 and 120 mg/L DU. BrdU staining (red) in the cortical neuroepithelium in control (D) and exposed (E and F) animals at the medial level of the brain. (G–H) Ratio of BrdU-positive area to total area (BrdU area/ 10^{-2} mm²) at the lateral and medial levels of the cortical and hippocampal neuroepithelia. DU: depleted uranium, CN: cortical neuroepithelium, HN: hippocampal neuroepithelium, VZ: ventricular zone, SVZ: sub-ventricular zone, CPP: cortical pre-plate; L: lateral, M: medial.

and SVZ of the cortical neuroepithelium and the IZ and SVZ of the hippocampal neuroepithelium for each exposure group and their number was not modified by U exposure (Fig. 4G and H).

3.2.3. Cell proliferation process

We investigated cell proliferation using BrdU incorporation into nuclei of dividing cells during the S phase of the cell cycle. At GD13, BrdU immunolabeling for control embryos was intense and distributed throughout the thickness of the cortical and hippocampal neuroepithelia. Neuronal nuclei with abundant BrdU immunoreactivity were observed in the CPP of the cortical neuroepithelium and in the IZ of the hippocampal neuroepithelium and in the SVZ and VZ of both neuroepithelia (Fig. 2D–F). A similar pattern of BrdU immunolabeling was identified in the cortical and hippocampal neuroepithelia at the lateral and medial

levels of embryos exposed to 40 mg/L and 120 mg/L DU (Fig. 2D–F). Quantitative analyses of the BrdU-positive area to total area showed no significant change between exposed and control animals (Fig. 2G and H).

In control fetuses from GD18, neuronal nuclei with abundant BrdU immunoreactivity were numerous and principally localized in the VZ and SVZ of the cortical, hippocampal and dentate neuroepithelia (Fig. 3D). No significant change in BrdU-positive staining was observed in the cortical and hippocampal neuroepithelia of fetuses exposed to 40 mg/L and 120 mg/L DU (Fig. 3E and F). In contrast, in the area of the dentate neuroepithelium, quantitative analysis revealed a significant increase of BrdU-positive labeling in fetuses exposed to 120 mg/L DU (control = $0.51 \pm 0.41 \times 10^{-2}$ mm², DU40 = $0.82 \pm 0.31 \times 10^{-2}$ mm², DU120 = $1.77 \pm 0.63 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0.01$) (Fig. 3G and H).

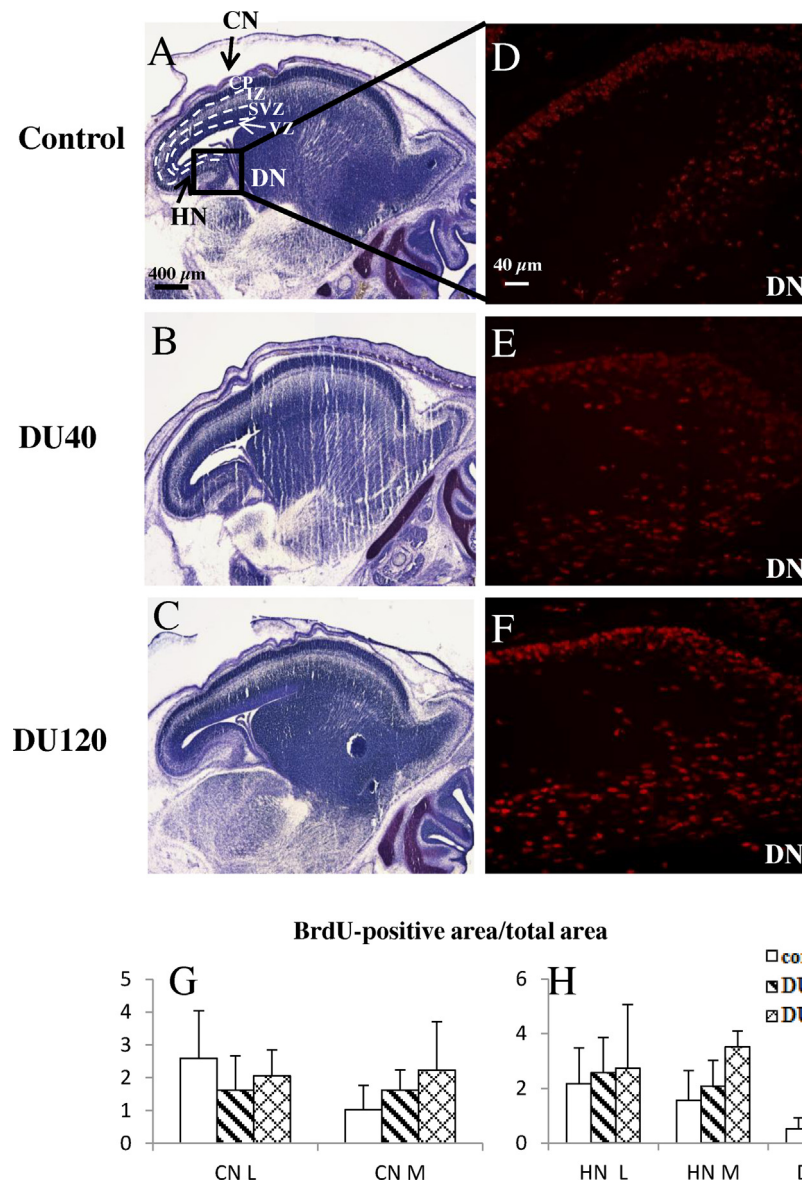


Fig. 3. Morphology and cell proliferation in fetuses from gestational day 18. (A–C) Nissl staining of the telencephalon of control fetuses and fetuses exposed to 40 and 120 mg/L DU. BrdU staining (red) in the dentate neuroepithelium in control (D) and exposed (E and F) animals at the medial level of the brain. (G–H) Ratio of BrdU-positive area to total area (BrdU area/ 10^{-2} mm²) at the lateral and medial levels of the cortical, hippocampal and dentate neuroepithelia of control and exposed fetuses. Asterisks indicate a significant difference between the exposed and control groups (one-way ANOVA, * $p < 0.05$). DU: depleted uranium. CN: cortical neuroepithelium, HN: hippocampal neuroepithelium, DN: dentate neuroepithelium; VZ: ventricular zone, SVZ: sub-ventricular zone, IZ: intermediate zone, CP: cortical plate, L: lateral, M: median.

3.3. Effects of DU on neurogenesis during neonatal and postnatal brain development

3.3.1. Hippocampal morphology

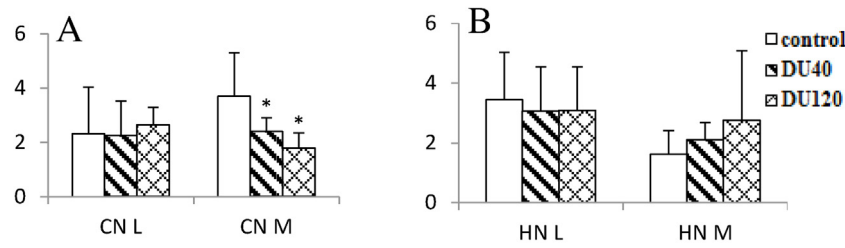
In rodents, most granular cells are produced after birth and the DG grew postnatally to maturity one month after birth. Our analyses of the DG were therefore conducted at four levels of the hippocampus from neonatal stage (PND0, PND5) and postnatal stage (PND21).

The hilus, the tertiary dentate matrix and the inner granule cell layer (GCL) had similar primitive features in exposed neonatal pups compared with controls (Figs. 5A–C and 6A–C), as described by Altman and Bayer (1990). Likewise, the morphology of the GCL, the hilus (H), and the molecular layer (ML) of exposed PND21 rats was similar to that of control animals (Fig. 7A–C).

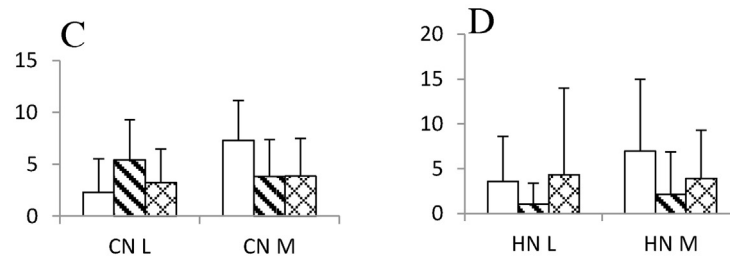
3.3.2. Cell death process

The cell death process, specifically in the DG, showed that fluorojade-positive cells were distributed in the GCL and in the H of the DG in both DU-exposed and control neonatal groups. The number of labeled cells was significantly increased in the DG in pups from both PND0 and PND5 exposed to 120 mg/L DU, as follows: PND0: control = $1.21 \pm 0.15 \times 10^{-2}$ mm², DU40 = $1.31 \pm 0.15 \times 10^{-2}$ mm², DU120 = $2.01 \pm 0.28 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0.01$ and PND5: control = $2.24 \pm 0.54 \times 10^{-2}$ mm², DU40 = $2.64 \pm 0.87 \times 10^{-2}$ mm², DU120 = $3.99 \pm 1.04 \times 10^{-2}$ mm², $p < 0.05$ (Fig. 8A and C). In addition, cleaved caspase 3-positive cells with pyknotic nuclei were identified in the GCL and H of control and DU-exposed animals. The number of caspase 3-positive cells was similar in control and DU-exposed newborn pups, but was significantly increased only in PND5 DU-exposed pups at DU120, as follows: control:

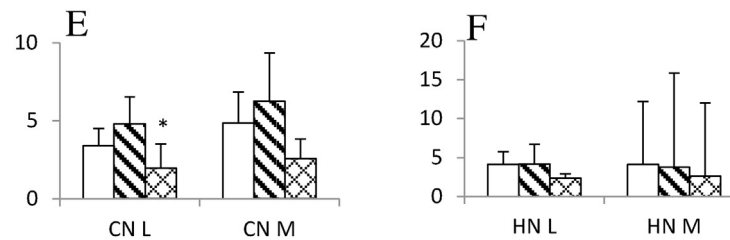
Fluorojade-positive cell number/total area at GD13



Cleaved caspase 3-positive cell number/total area at GD13



Fluorojade-positive cell number/total area at GD18



Cleaved caspase 3-positive cell number/total area at GD18

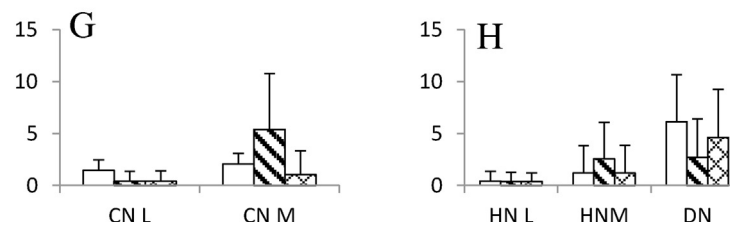


Fig. 4. Cell death at prenatal stages. Ratio of fluorojade-positive cell number to total area (10^{-2} mm^2) at the lateral and medial levels of the cortical and hippocampal neuroepithelia in embryos from GD13 (A–B) and in fetuses from GD18 (E–F). Ratio of cleaved caspase 3-positive cell number to total area (10^{-3} mm^2) at the lateral and medial level of the cortical and hippocampal neuroepithelia in embryos (C–D) and in fetuses (G–H). Asterisks indicate a significant difference between the DU-exposed and control groups (one-way ANOVA, * $p < 0.05$). GD: gestational day, DU: depleted uranium. CN: cortical neuroepithelium, HN: hippocampal neuroepithelium, DN: dentate neuroepithelium, L: lateral, M: median.

$0.59 \pm 0.85 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$, DU40 = $1.13 \pm 0.90 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$, DU120 = $2.96 \pm 1.87 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$, * $p < 0.05$ (Fig. 8B and D).

In the DG of PND21 rats, fluorojade assay showed few labeled cells in the GCL in controls as well as in DU-exposed rats. Quantitative analyses of fluorojade-positive cells did not show any significant difference in DU-exposed compared with control groups (Fig. 8E). Very few activated caspase-positive cells with pyknotic nuclei were stained in the GCL and no modification was observed in the number of positive cells between exposed and control animals (Fig. 8F).

3.3.3. Cell proliferation process

In the hippocampus of control animals, the BrdU-positive nuclei at PND0 and PND5 were principally round in shape and were distributed in the GCL and in the H of the DG (Figs. Fig. 5 and 6D). Quantitative analysis showed no modification of BrdU staining in the DG between control and DU-exposed groups (Figs. 5D–G and 6D–G). In the DG of PND 21 rats, round BrdU-positive nuclei were principally located in the GCL and subgranular zone (SGZ) in control and in DU-exposed animals (Fig. 7D–F). Whereas no change was observed for the DU40-exposed group, quantitative analyses

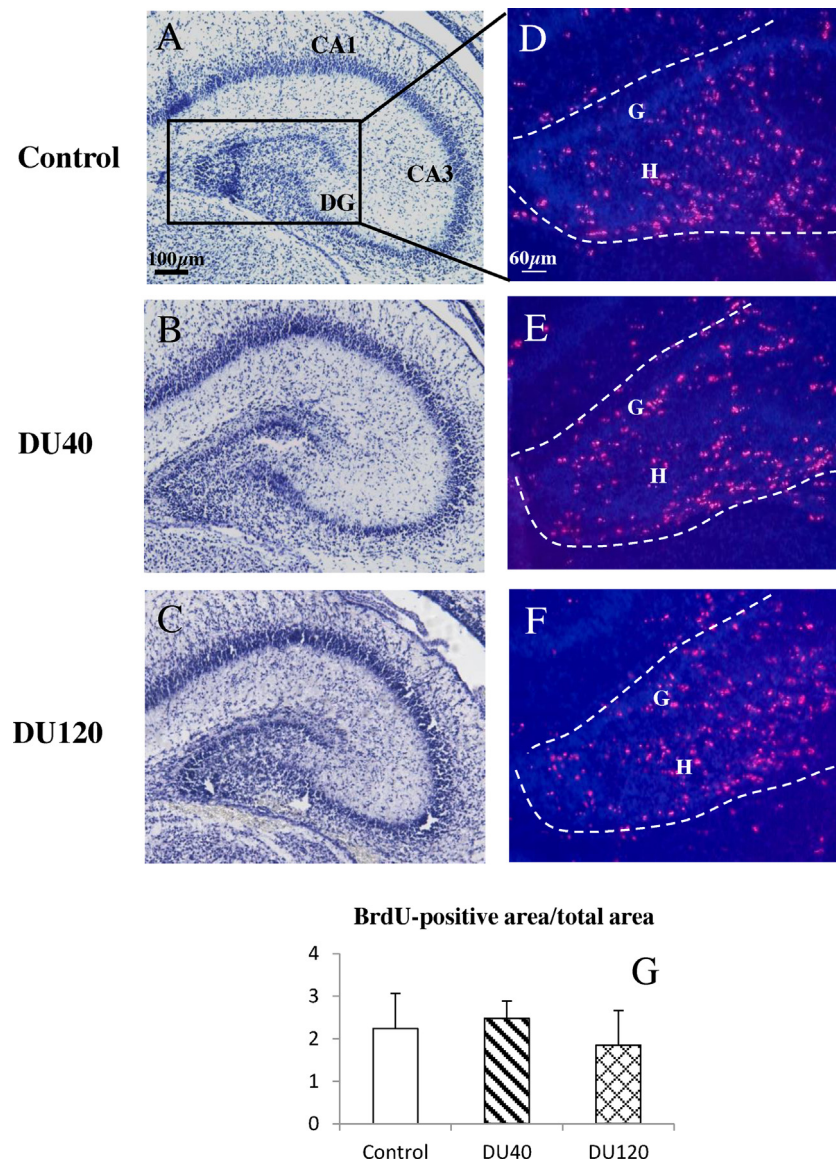


Fig. 5. Morphology and cell proliferation at postnatal day 0. (A–C) Nissl staining of the hippocampus of PND0 control pups and pups exposed to 40 and 120 mg/L DU. BrdU staining (red) in the dentate gyrus of the hippocampus in control (D) and exposed (E and F) animals. (G) Ratio of BrdU-positive area to total area (BrdU area/ 10^{-2} mm²) of the dentate gyrus of pups. PND: postnatal day, DU: depleted uranium, H: hilus, G: granular zone, CA: Ammon's horn, DG: dentate gyrus.

showed a significant decrease in the number of BrdU-positive cells in the GCL of young rats exposed to 120 mg/L DU (PND21: control = 3.62 ± 1.47 , DU40 = 2.54 ± 0.71 , DU120 = 1.85 ± 0.45 , $p < 0.05$) (Fig. 7G).

4. Discussion

Humans are continuously exposed to neurotoxic compounds from early life to adulthood. The central nervous system develops over a long period of time extending from embryogenesis through puberty, including vulnerable periods when normal development can be modified. Thus, exposure to heavy metals like U during these critical periods could affect brain development and have an impact on cognitive functions (Desi et al., 1998; Lehotzky et al., 1990). We demonstrate here for the first time that chronic internal exposure to DU can disturb the processes of neurogenesis during brain development.

The concentrations of DU measured in the kidney of the pregnant rats and in the bodies or kidneys of embryos, fetuses

and pups confirmed that animals were well exposed. We observed no accumulation of DU in embryos or fetuses from GD13 or GD18, respectively. However, from PND0 to PND21, a dose- and time-dependent accumulation of DU was clearly demonstrated. Thus, our data suggest that embryos and fetuses did not accumulate DU until gestational day 18, as previously reported (Sanchez et al., 2006), but that DU might accumulate in the last days of gestation until birth. It has been shown that U was detected in the placenta as well as in fetuses after exposure at high doses of U (Domingo, 2001; Sanchez et al., 2006). The accumulation of DU at postnatal stages strongly suggests that pups were exposed via their mothers' milk, as demonstrated in humans (Wappelhorst et al., 2002). In addition, the very high quantity of U in the kidneys of PND 21 rats could be explained by the fact that the animals began to drink water directly from the feeding bottle. Like our study, Sanchez et al. (2006) measured a high quantity of U in kidney of pups exposed *in utero* until PND30 but did not detect U quantity in the brain of pups even at the highest doses of U.

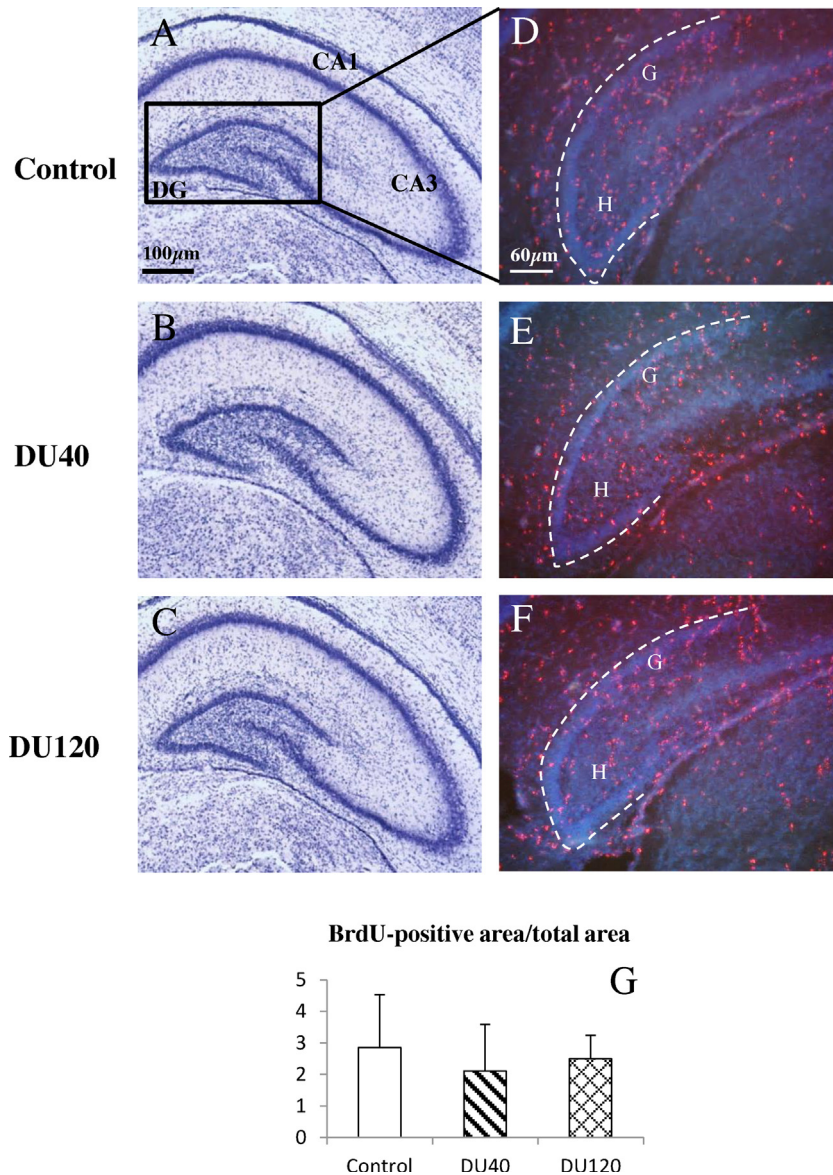


Fig. 6. Morphology and cell proliferation at postnatal day 5. (A–C) Nissl staining of the hippocampus of PND5 control pups and pups exposed to 40 and 120 mg/L DU. BrdU staining (red) in the dentate gyrus of the hippocampus in control (D) and exposed (E and F) animals. (G) Ratio of BrdU-positive area to total area (BrdU area/mm²) in the dentate gyrus of PND5 rats. PND: postnatal day, DU: depleted uranium, H: hilus, G: granular zone, CA: Ammon's horn, DG: dentate gyrus.

Prenatal exposure to 40 and 120 mg/L DU did not affect maternal weight gain during pregnancy, litter size or the body weight of embryos and fetuses. Contrary to our results, previous studies have shown a decrease in maternal body weight gain and a decrease in fetal body weight after subcutaneous injection of U or after ingestion of high doses of U during gestation (Domingo, 2001). These discrepancies could be explained by differences in the contamination protocol used and by the U concentration administered. On the other hand, our data showed that DU altered body weight after birth, as previously demonstrated (Domingo, 2001; Sanchez et al., 2006).

We explored brain development at GD13 and GD18 in three structures of the telencephalon, the cortical, hippocampal and dentate neuroepithelia. In rodents, the embryonic stage during GD13 is the most intense proliferation stage and at fetal stage GD18, cortical cell layers begin to appear (Abdel-Mannan et al., 2008). Hippocampal regions begin to form in fetuses from GD15 to GD21 and the dentate granular cells appear mostly in fetuses after

GD18 (Bayer, 1980). As a consequence, altered neurogenesis, especially neuronal cell death and cell proliferation at these time points, could affect brain development.

Our results showed a decrease in cell death by fluorojade staining in the cortical neuroepithelium of embryos exposed from 40 mg/L DU and fetuses exposed to 120 mg/L DU. Nevertheless, no change in pyknotic cell number associated with cleaved caspase 3 staining was observed in exposed animals. These results suggest that other pathways than apoptosis could be affected by DU toxicity, like necrosis (Oppenheim, 1991). In this study, we demonstrated for the first time that *in utero* contamination with DU causes an imbalance of the cell death process during prenatal brain development.

Cell proliferation investigated by BrdU labeling was not modified in the cortical and hippocampal neuroepithelia of DU-exposed embryos from GD13 and fetuses from GD18. However, the density of dividing cells increased in the dentate neuroepithelium of fetuses exposed to DU at the highest dose. Consistent with

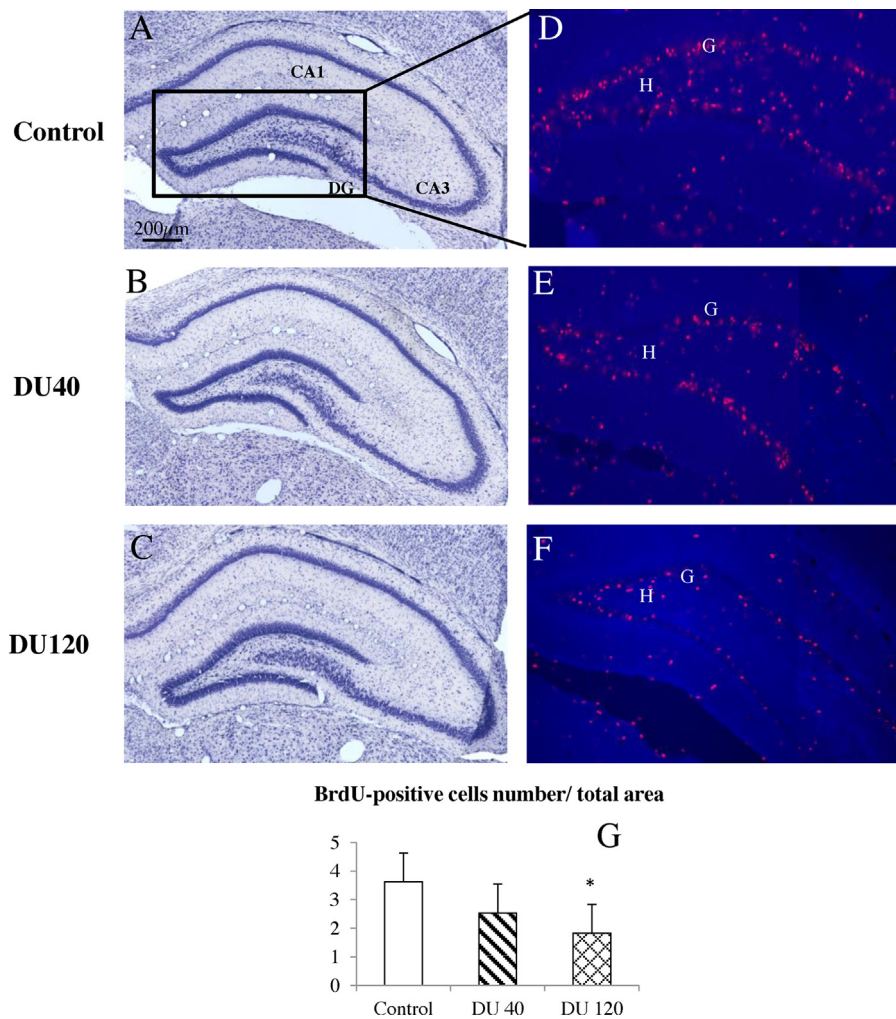


Fig. 7. Morphology and cell proliferation at postnatal day 21. (A–C) Nissl staining of the hippocampus of control pups and pups exposed to 40 and 120 mg/L DU. BrdU staining (red) in the dentate gyrus of the hippocampus in control (D) and exposed (E and F) animals. (G) Ratio of BrdU-positive cell number to total area (BrdU positive cells/mm²) of the granular cell layer in the dentate gyrus of PND21 rats. Asterisks indicate a significant difference between the exposed and control groups (one-way ANOVA, * $p < 0.05$). PND: postnatal day, DU: depleted uranium, H: hilus, G: granular cell layer, CA: Ammon's horn, DG: dentate gyrus.

current knowledge about the cell cycle of cortical precursor cells at this time of development, only neuronal progenitors were labeled when BrdU was injected 4 h before sacrifice (Caleari et al., 2005). Our results suggest that DU may act on cell proliferation by intensifying the production of dividing neural progenitors specifically in the dentate neuroepithelium during development.

Despite these confined changes in cell death pathways and cell proliferation, no major organogenesis or developmental disturbance was observed in the telencephalon, as seen in the layer organization. It has been reported that U induces more brain malformations and developmental variations in fetuses, such as exencephaly at high doses (Domingo, 2001). In our experimental conditions, these types of malformations were never observed. Nevertheless, the U-induced alterations in neurogenesis that we observed prenatally could impact subsequent postnatal brain development.

We then focused on the development of the hippocampus after birth until weaning. At birth, the CA1, CA2 and CA3 regions are well organized in layers. However, the DG is immature and 85% of cells will be generated between PND0 and PND21 (Altman and Bayer, 1990). Cell death and cell proliferation were thus investigated in the DG during neonatal and postnatal development.

We observed an increase of cell death by fluorojade staining in the dentate gyrus of PND0 and PND5 exposed pups associated with

a significant increase of apoptotic cell number in PND5 exposed pups. At PND0, our data show also an increase of apoptotic cell number in exposed pups but it was not significant. This increase of the cell death has been observed only at the highest dose of DU exposure. Therefore, our results suggest that apoptosis seems to be one of the pathways of cell death affected by DU, but it could also disturb cell death by acting on different pathways during postnatal development (Oppenheim, 1991). Our results suggest also that DU affects cell death pathways only at early stage of development since no modification has been observed at PND21.

Our results on cell proliferation showed no change in BrdU labeling in the DG of new born pups and pups exposed until PND5. However, at later postnatal stage, the number of dividing cells was diminished in the GCL and the SGZ in the DG exposed to the highest dose of DU. During later development of the DG, the proliferative cells become confined to the SGZ. PND21 is thus a transition stage between developmental and young adult periods and the SGZ becomes the granule cells production of the adult neurogenic zone. Based on these data, our results suggest that DU could cause a decrease in dividing cells in the DG of young adult rats exposed to U during gestation and weaning.

Despite these alterations, the development of the hippocampus did not appear to be disrupted, as seen by the well organization of the layers of the DG at PND21. It is well known that neurogenesis in

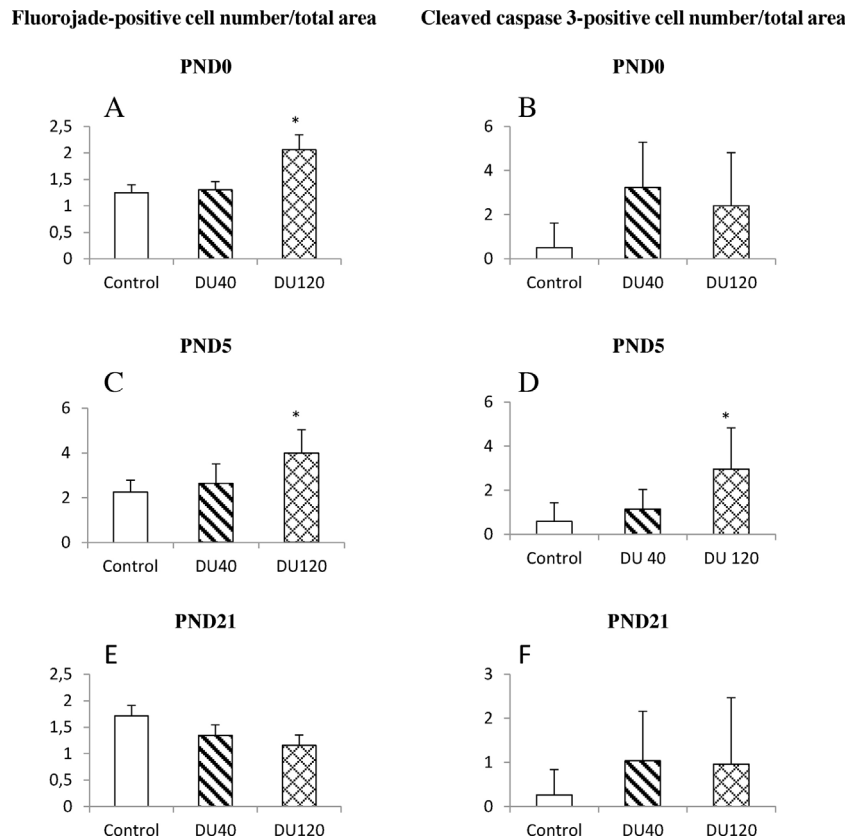


Fig. 8. Cell death at postnatal stages. Ratio of fluorojade-positive cell number to total area (10⁻² mm²) of the dentate gyrus at PND0 (A), PND5 (C) and of granular cell layer at PND21 (E). Ratio of cleaved caspase 3-positive cell number to total area (10⁻³ mm²) of the dentate gyrus at PND0 (B), PND5 (D) and of granular cell layer at PND21 (F). Asterisks indicate a significant difference between the exposed and control groups (one-way ANOVA, * *p* < 0.05). PND: postnatal day, DU: depleted uranium.

the hippocampus represents a form of synaptic plasticity in the adult brain that is crucial in learning and memory (Deng et al., 2010). The decrease of new born cells that we observed in the DG at PND21 could thus impair synaptic plasticity and might cause cognitive dysfunctions in adulthood. No study is available about the effect of DU on cognitive functions after exposure during prenatal development. Only two studies have shown that exposure to DU from birth to 2 months impairs object recognition memory and causes a decrease of locomotor activity and an increase of anxiety (Lestaevel et al., 2013, 2015), that could be correlated with a change in neurogenesis.

The effects of the chemical toxicity of U appear similar to those of other heavy metals, which are known to cause behavioral disorders in offspring after exposure during brain development (Desi et al., 1998). The exact mechanisms by which heavy metals alter behavior are unknown. Nonetheless, exposure to lead from gestation to adult life decreased the proliferation of new born cells in the DG (Verina et al., 2007), results similar to ours. Lead exposure from birth to PND30 also reduced generation of new born cells in the DG in 3-month-old rats (Jaako-Movits et al., 2005). In addition, an increase in the number of apoptotic cells was also seen in the cortex and hippocampus of neonatal mouse brain (Dribben et al., 2011) and in the hippocampus of PND30 rats after lead exposure (Liu et al., 2010). Finally, a direct correlation between behavior disorders and neurogenesis has been demonstrated in a developmental zebrafish model but not in rodent (Dou and Zhang, 2011). In the mammalian brain, the complexity of the molecular pathways underlying neurogenesis means that there are various targets that might be impacted by DU exposure. We have shown that DU exposure during brain development results in some disturbances in cell death and in cell proliferation. A modification

of these two processes could have an impact on the subsequent steps of neurogenesis, as already shown for heavy metals (Jaako-Movits et al., 2005; Verina et al., 2007).

5. Conclusion

In conclusion, our results are the first to show that DU exposure during gestation and lactation could cause localized alterations in neurogenesis at specific times and mainly at the highest dose. We show that DU did not accumulate until GD18 in the fetuses, suggesting that it is DU from the pregnant rats that could indirectly affect neurogenesis. In contrast, the quantity of DU found in neonatal and postnatal pups could directly cause observed effects. In addition, our results suggest that the effects are opposed between prenatal and postnatal development. Indeed, whereas DU seems to increase cell proliferation in the dentate neuroepithelium and decrease the cell death pathway throughout prenatal development, it causes a decrease of cell proliferation in the DG and increase of cell death pathway during postnatal development. Even though these modifications do not lead to major morphological changes in the development of brain structures, they could have an impact on the next steps of neurogenesis as neuronal differentiation, migration and synaptic integrity in neural networks and might disturb cerebral functions in adulthood. Most of epidemiologic studies have been performed on adults but long term consequences of U exposure on sensitive populations are still unknown. Our data show that brain development is sensitive to DU exposure. The release of U into the environment could present a threat to human health, particularly for pregnant women and children who represent a more vulnerable population.

Funding information

This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and European DoReMi program (Low Dose Research towards Multidisciplinary integration).

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank Jean-Marc Bertho for advice and Frederic Voyer, Thierry Loiseau and Jean-Michel Guisquet for animal care.

References

- Abdel-Mannan, O., Cheung, A.F., Molnar, Z., 2008. Evolution of cortical neurogenesis. *Brain Res. Bull.* 75 (2–4), 398–404.
- Altman, J., Bayer, S.A., 1990. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* 301 (3), 365–381.
- ATSDR, 2013. Toxicological Profile for Uranium. Public Health Service, Atlanta, GA.
- Bayer, S.A., 1980. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.* 190 (1), 115–134.
- Bensoussan, H., Grancolas, L., Dhieux-Lestaevel, B., Delissen, O., Vacher, C.M., Dublineau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., Taouis, M., Lestaevel, P., 2009. Heavy metal uranium affects the brain cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* 261 (1–2), 59–67.
- Briner, W., 2010. The toxicity of depleted uranium. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7 (1), 303–313.
- Briner, W., Abboud, B., 2002. Behavior of juvenile mice chronically exposed to depleted uranium. In: Khassanova, L., Collery, P.H., Maynard, I., Khassanova, Z., Etienne, J.C. (Eds.), *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libby Eurotext, Paris, pp. 353–356.
- Briner, W., Davis, D., 2002. Lipid oxidation and behavior are correlated in depleted uranium exposed mice. In: Khassanova, L., Collery, P., Maynard, I., Khassanova, Z., Etienne, J.C. (Eds.), *Metal Ions in Biology and Medicine*, vol. 7. John Libby Eurotext, Paris, pp. 59–63.
- Briner, W., Murray, J., 2005. Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (1), 135–144.
- Bussy, C., Lestaevel, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., Houpert, P., 2006. Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27 (2), 245–252.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W.B., 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25 (28), 6533–6538 (the official journal of the Society for Neuroscience).
- Chow, E.S., Hui, M.N., Lin, C.C., Cheng, S.H., 2008. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development. *Aquat. Toxicol.* 87 (3), 157–169.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H., 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (5), 339–350.
- Desi, I., Nagymajtenyi, L., Schulz, H., 1998. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *J. Appl. Toxicol.* 18 (1), 63–70.
- Domingo, J.L., Llobet, J.M., Tomas, J.M., Corbella, J., 1987. Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (1), 168–174.
- Domingo, J.L., 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod. Toxicol.* 15 (6), 603–609.
- Dou, C., Zhang, J., 2011. Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. *J. Hazard. Mater.* 194, 277–282.
- Dribben, W.H., Creeley, C.E., Farber, N., 2011. Low-level lead exposure triggers neuronal apoptosis in the developing mouse brain. *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (4), 473–480.
- Gotz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (10), 777–788.
- Houpert, P., Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Gourmelon, P., 2005. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26 (6), 1015–1020.
- Houpert, P., Frelon, S., Lestaevel, P., Bussy, C., Gourmelon, P., Paquet, F., 2007. Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology* 28 (1), 108–113.
- Howland, J.W., 1948. Comprehensive summary of the pharmacology and toxicology of uranium compounds; studies on human exposures to uranium compounds. *At. Energy Biophys. Biol. Med.* 1 (5), 174.
- Jaako-Movits, K., Zharkovsky, T., Romantchik, O., Jurgenson, M., Merisalu, E., Heidmets, L.T., Zharkovsky, A., 2005. Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23 (7), 627–635 (the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience).
- Lehotzky, K., Ungvary, G., Polinak, D., Kiss, A., 1990. Behavioral deficits due to prenatal exposure to cadmium chloride in CFY rat pups. *Neurotoxicol. Teratol.* 12 (2), 169–172.
- Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C., Scherrmann, J.M., 2003. Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiat. Prot. Dosimetry* 105 (1–4), 243–245.
- Lestaevel, P., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Vacher, C.M., Dublineau, I., Voisin, P., Taouis, M., 2013. Cerebral cortex and hippocampus respond differently after post-natal exposure to uranium. *J. Toxicol. Sci.* 38 (5), 803–811.
- Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P., Gourmelon, P., 2005a. Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (6), 835–840.
- Lestaevel, P., Dhieux, B., Delissen, O., Benderitter, M., Aigueperse, J., 2015. Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth. *J. Toxicol. Sci.* 40 (1), 99–107.
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., Paquet, F., 2005b. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212 (2–3), 219–226.
- Lestaevel, P., Romero, E., Dhieux, B., Ben Soussan, H., Berradi, H., Dublineau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., 2009. Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258 (1), 1–9.
- Liu, J., Han, D., Li, Y., Zheng, L., Gu, C., Piao, Z., Au, W.W., Xu, X., Huo, X., 2010. Lead affects apoptosis and related gene XIAP and Smac expression in the hippocampus of developing rats. *Neurochem. Res.* 35 (3), 473–479.
- Liu, J., Lewis, G., 2014. Environmental toxicity and poor cognitive outcomes in children and adults. *J. Environ. Health* 76 (6), 130–138.
- McDiarmid, M.A., Hooper, F.J., Squibb, K., McPhaul, K., Engelhardt, S.M., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., 2002. Health effects and biological monitoring results of Gulf War veterans exposed to depleted uranium. *Mil. Med.* 167 (Suppl. 2), 123–124.
- Ming, G.L., Song, H., 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223–250.
- Oppenheim, R.W., 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453–501.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A.M., Frelon, S., Gourmelon, P., 2006. Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health Phys.* 90 (2), 139–147.
- Paternain, J.L., Domingo, J.L., Ortega, A., Llobet, J.M., 1989. The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17 (3), 291–296.
- Rice, D., Barone Jr., S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 3), 511–533.
- Sanchez, D.J., Belles, M., Albina, M.L., Gomez, M., Linares, V., Domingo, J.L., 2006. Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology* 228 (2–3), 323–332.
- Schmued, L.C., Stowers, C.C., Scallet, A.C., Xu, L., 2005. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 1035 (1), 24–31.
- Verina, T., Rohde, C.A., Guilarte, T.R., 2007. Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. *Neuroscience* 145 (3), 1037–1047.
- Wappelhorst, O., Kuhn, I., Heidenreich, H., Markert, B., 2002. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* 18 (4), 316–322.

3.2.2 Modifications dans le processus de différenciation neuronale aux stades prénatals et postnatals

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux effets de l'uranium après exposition dès le stade *in utero* sur le processus de différenciation neuronale aux stades prénatals et postnatals. La transition vers la voie de différenciation neuronale implique l'activation de gènes pro-neuronaux, mais également la répression de gènes inhibiteurs.

Dans une étude préliminaire, l'expression génique de certains de ces gènes dont les gènes Wnt3a, GAP43, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 a été analysée par RT-PCR, dans le cerveau des embryons et des fœtus et dans l'hippocampe des rats P0, P5 et P21. Suite à cette étude, des analyses qualitatives et semi-quantitatives d'hybridation *in situ* ont été réalisées en se focalisant sur des gènes et des stades d'étude bien spécifiques. Le développement de l'hippocampe requiert l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β caténine dont le gène Wnt3a qui joue un rôle essentiel dans l'initiation du développement de l'hippocampe. La voie de signalisation bHLH joue également un rôle important dans le processus de différenciation neuronale. Les gènes Notch1 et Mash1 participent à la détermination vers la voie neuronale et sont exprimés dans les progéniteurs neuronaux. Les gènes NeuroD et NeuroD2, exprimés dans les neurones immatures puis matures participent à la différenciation et à la maturation neuronales. C'est pourquoi, l'expression du gène Wnt3a a été étudié au stade E13. De plus, l'expression des gènes Notch1, Mash1 et NeuroD a été étudiée dans les neuroépithélia hippocampiques et dentés au stade E18 et dans le gyrus denté au stade P5. L'expression du gène NeuroD2 a également été étudiée à P5. Enfin, des études immunohistochimiques de la nestine et de la doublecortine ont été réalisées à tous les stades de développement. En parallèle de ces analyses, les activités locomotrice et exploratrice, la mémoire spatiale et la dépression ont été testées chez les rats au stade P21.

3.2.2.1 Expression des gènes Wnt3a, Gap43, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 par RT-PCR

3.2.2.1.1 Aux stades prénatals

Au stade E13, une diminution significative de l'expression de Wnt3a a été observée au niveau du cerveau des embryons exposés à 40 (-54 %) et à 120 mg/L (-59,2 %) d'uranium. Aucune modification de l'expression des gènes Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 n'a été mise en évidence à ce stade. De plus, aucune modification de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation neuronale n'a été observée dans le cerveau des fœtus E18 exposés à l'uranium (figure 23).

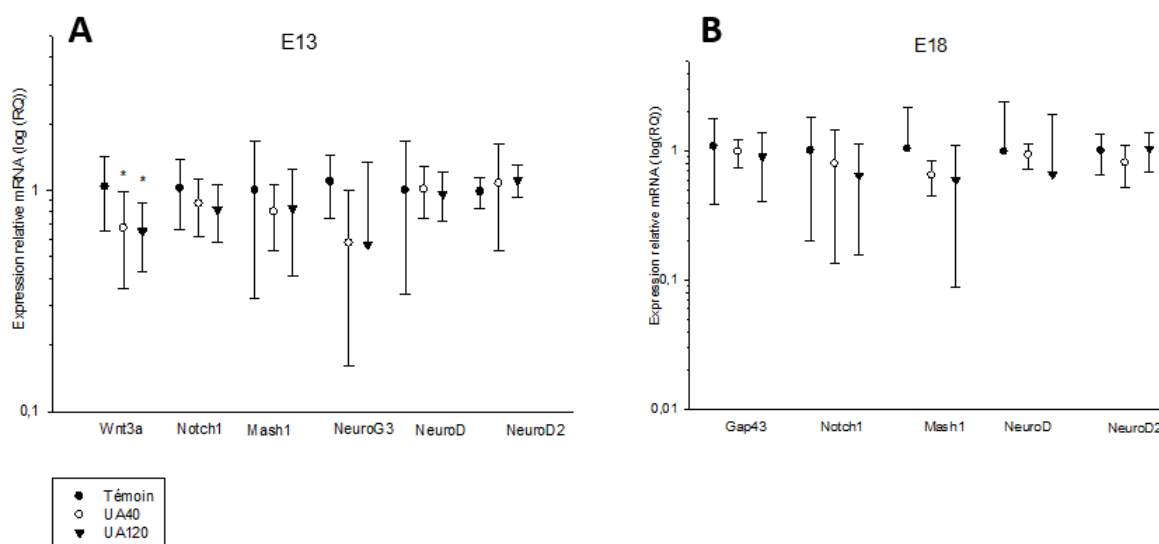


FIGURE 23 – Expression des gènes Wnt3a, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 à E13 et E18

Les résultats sont exprimés en log de RQ qui est normalisé par rapport aux gènes de référence. La mesure de la variance (test ANOVA) a été utilisée pour les tests statistiques et la différence est significative si * $p < 0,05$.

3.2.2.1.2 Aux stades postnatals

Aucune modification dans l'expression des gènes Gap43, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 impliqués dans le processus de différenciation neuronale n'a été observée dans l'hippocampe des rats nouveau-nés. Au stade P5, seule une diminution significative de l'expression du gène Mash1 (-46,8 %) a été mise en évidence chez les rats exposés à 40 mg/L d'uranium, sans modification de l'expression des autres gènes. Enfin, une diminution significative des gènes Mash1 (-27,2 %) et Gap43 (-33,1 %) a été observée dans l'hippocampe des rats exposés à l'uranium à 120 mg/L jusqu'à 21 jours après la naissance sans modification de l'expression des gènes Notch1, NeuroD et NeuroD2 (figure 24).

3.2.2.2 Étude du processus de différenciation neuronale au niveau du neuroépithélium hippocampique après exposition à l'uranium à 40 mg/L

Dans cette partie seront décrits les résultats des études de différenciation neuronale aux stades prénatals et postnatals par analyses d'hybridation *in situ* et par immunohistochimie obtenus après exposition à l'uranium à la concentration de 40 mg/L. La dose de 40 mg/L correspond au double des concentrations maximales retrouvées dans les eaux souterraines en Finlande (Prat *et al.* 2009). Les analyses ont été réalisées de la même façon que dans l'article « Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring » (cf. 3.2.2.3).

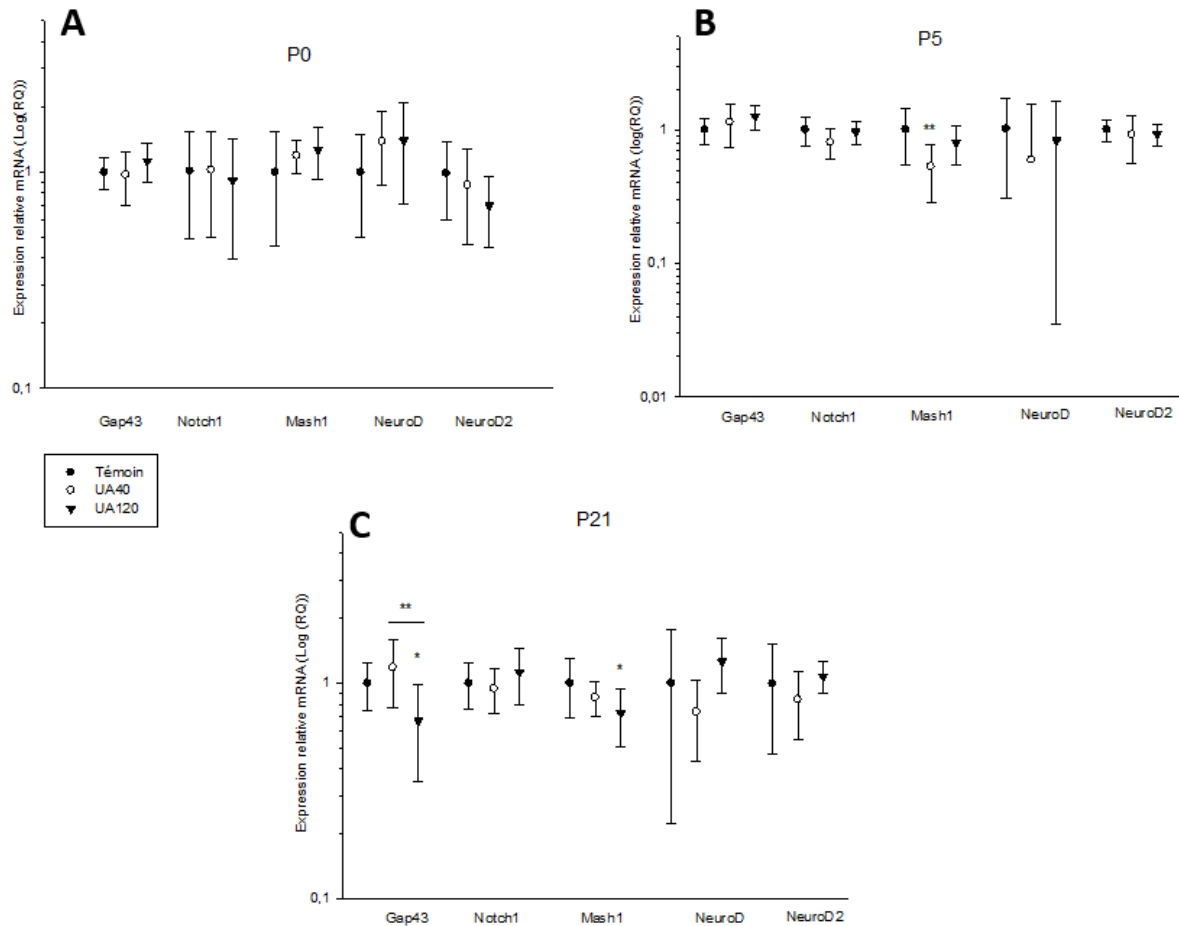


FIGURE 24 – Expression des gènes Gap43, Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 à P0, P5 et P21

Les résultats sont exprimés en log de RQ qui est normalisé par rapport aux gènes de référence. La mesure de la variance (test ANOVA) à été utilisée pour les tests statistiques et la différence est significative si * $p < 0,05$.

3.2.2.2.1 Expression génique *in situ* aux stades prénatals

Au stade E13, les cellules exprimant Wnt3a sont localisées principalement dans le neuroépithélium hippocampique des embryons témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. L'analyse par scoring n'a pas révélé de différence dans l'intensité d'expression de Wnt3a entre les groupes témoin et exposé à l'uranium (figure 25).

Au niveau du neuroépithélium des fœtus E18 non exposés à l'uranium, les cellules exprimant Notch1 et Mash1 sont principalement localisées dans la ZV des neuroépithélia hippocampique et denté. À ce stade de développement, les cellules exprimant NeuroD sont principalement localisées au niveau de la plaque hippocampique du neuroépithélium. Après exposition à l'uranium à 40 mg/L, aucune modification dans la distribution de l'expression de ces gènes ni dans l'intensité d'expression n'a été observé en comparaison aux animaux témoins (figure 26).

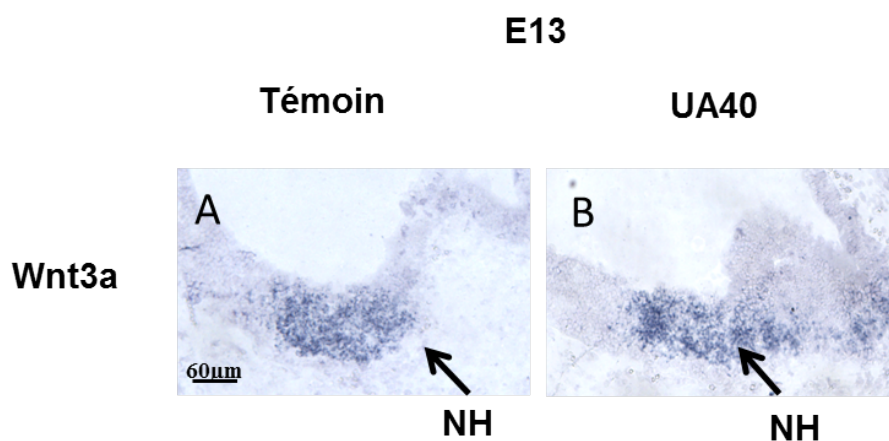


FIGURE 25 – Hybridation *in situ* du gène Wnt3a au stade E13

Expression de Wnt3a dans le neuroépithélium hippocampique des embryons E13 témoins (A) et exposés à l'uranium à 40 mg/L (B). NH : neuroépithélium hippocampique.

3.2.2.2.2 Étude de la nestine et de la doublecortine aux stades prénatals

Au stade E13, la nestine est localisée dans les cellules souches neurales au niveau de la ZV et par les cellules gliales radiales au niveau des ZSV et zone intermédiaire (ZI). L'analyse de la surface de la nestine marquée sur la surface totale du neuroépithélium hippocampique n'a pas montré de différence entre les embryons témoins et exposés à l'uranium (figure 27).

Au stade E18, la nestine est localisée au niveau de toute l'épaisseur des neuroépithélia hippocampique et denté, dans les zones ventriculaire, sous ventriculaire et dans la plaque hippocampique des fœtus témoins et exposés à l'uranium. La surface de la nestine marquée par rapport à la surface totale des neuroépithélia hippocampique et denté est similaire entre le groupe témoin et exposé à l'uranium (figure 27).

Au stade E13, les cellules dont la DCX est marquée sont localisées principalement en fine couche au niveau de la ZI du neuroépithélium hippocampique. Quelques corps cellulaires dont la DCX est marquée sont également distribués au niveau de la ZSV. L'analyse n'a pas révélé de différence dans la localisation, la distribution et l'expression du marquage entre le groupe témoin et le groupe d'embryons exposés à 40 mg/L d'uranium (figure 28).

Chez les fœtus E18, les cellules dont la DCX est marquée sont localisées dans la ZSV et la plaque hippocampique du neuroépithélium de façon similaire entre les groupes témoin et exposé à l'uranium. L'analyse quantitative a révélé une diminution du marquage de la DCX uniquement au niveau latéral du neuroépithélium cortical des fœtus exposés à 40 mg/L d'uranium (figure 28).

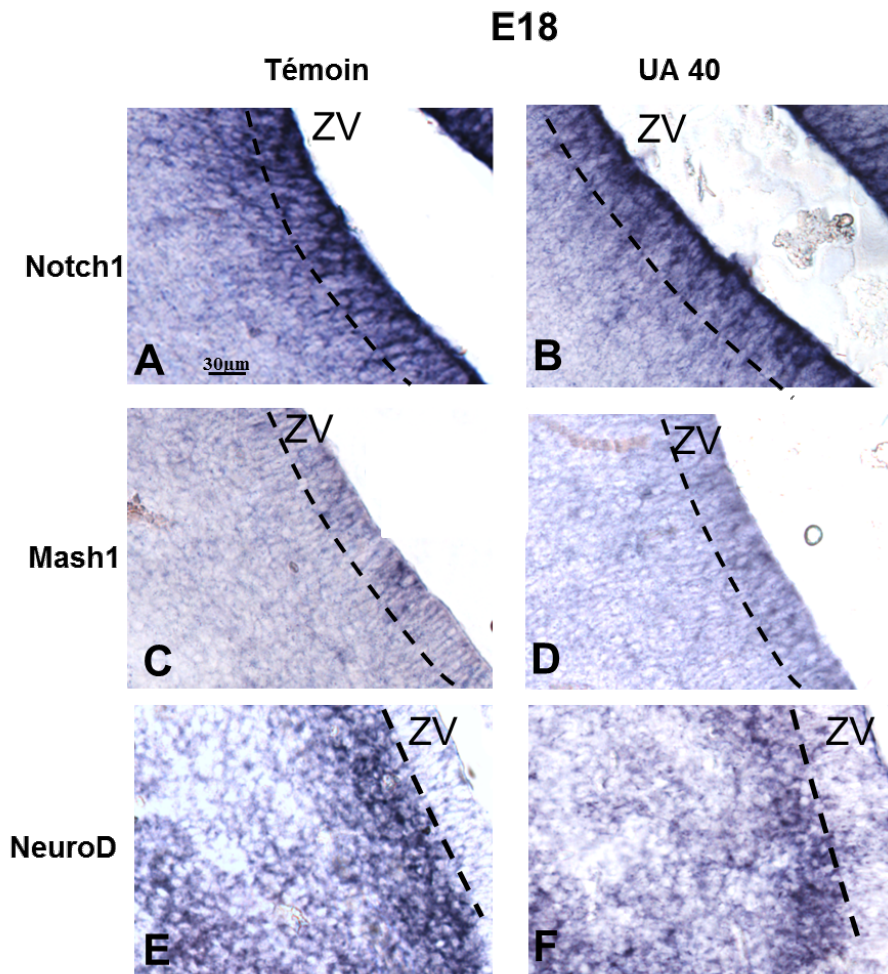


FIGURE 26 – Hybridation *in situ* des gènes Notch1, Mash1 et NeuroD au stade E18
 Expression de Notch1 (A,B), Mash1 (C,D) et NeuroD (E,F) dans le neuroépithélium hippocampique des fœtus E18 témoins et exposés à l’uranium à 40 mg/L. ZV : zone ventriculaire zone, UA : uranium appauvri.

3.2.2.2.3 Expression génique *in situ* au stade P5

À ce stade, les cellules exprimant Notch1 sont localisées dans la ZV du neuroépithélium. Les cellules exprimant Mash1 sont localisées au niveau de la matrice dentée tertiaire et dans la zone sous-granulaire du gyrus denté. Le gène NeuroD est principalement exprimé par les cellules dans la matrice dentée tertiaire alors que le gène NeuroD2 est exprimé par les cellules de la couche granulaire. L’analyse par scoring n’a pas révélé de différence dans la distribution de l’expression de ces gènes ni dans l’intensité d’expression entre le groupe témoin et exposé à l’uranium (figure 29).

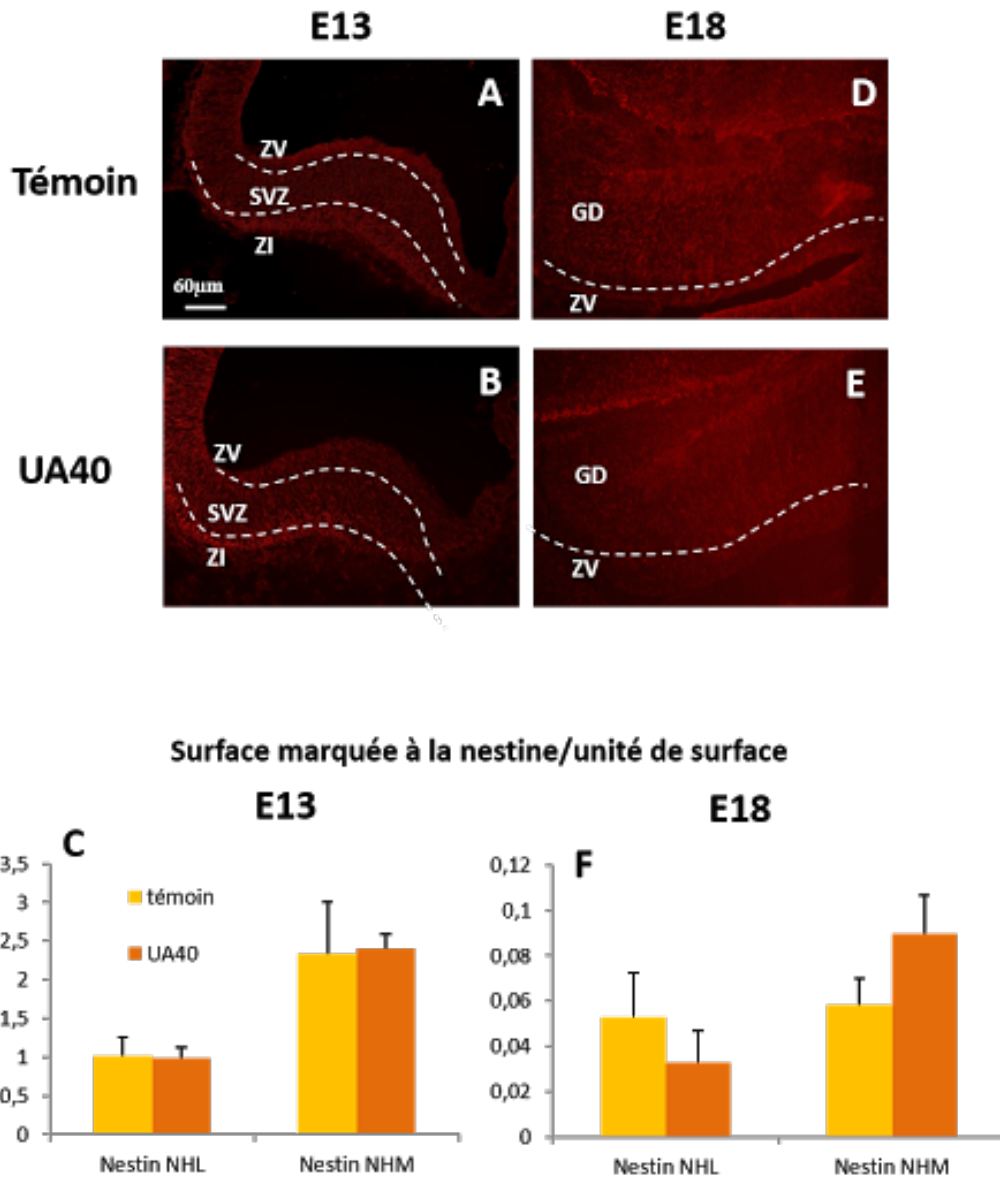


FIGURE 27 – Marquage immunohistochimique de la nestine aux stades E13 et E18

A,B : Marquage immunohistochimique de la nestine dans la neuroépithélium hippocampique des embryons témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. C : Quantification de la surface de la nestine marquée (surface de la nestine marquée/unité de surface) au niveau latéral et médian du neuroépithélium hippocampique des embryons témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. D,E : Marquage immunohistochimique de la nestine dans la neuroépithélium hippocampique des fœtus témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L d'uranium. F : Quantification de la surface de nestine marquée (surface de la nestine marquée/unité de surface) au niveau latéral et médian du neuroépithélium hippocampique des fœtus témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. UA : uranium appauvri, NHL : Neuroépithélium hippocampique latéral, NHM : Neuroépithélium hippocampique médian, ZV : zone ventriculaire zone, ZSV : zone sous ventriculaire, ZI : zone intermédiaire, GD : gyrus denté.

3.2.2.2.4 Étude de la doublecortine aux stades postnatals

Dans l'hippocampe des rats P0 et P5, la DCX est exprimée au niveau des corps cellulaires et des prolongements dendritiques au niveau de la future couche des cellules granulaires et du hile aussi bien pour les rats témoins que ceux exposés à l'uranium.

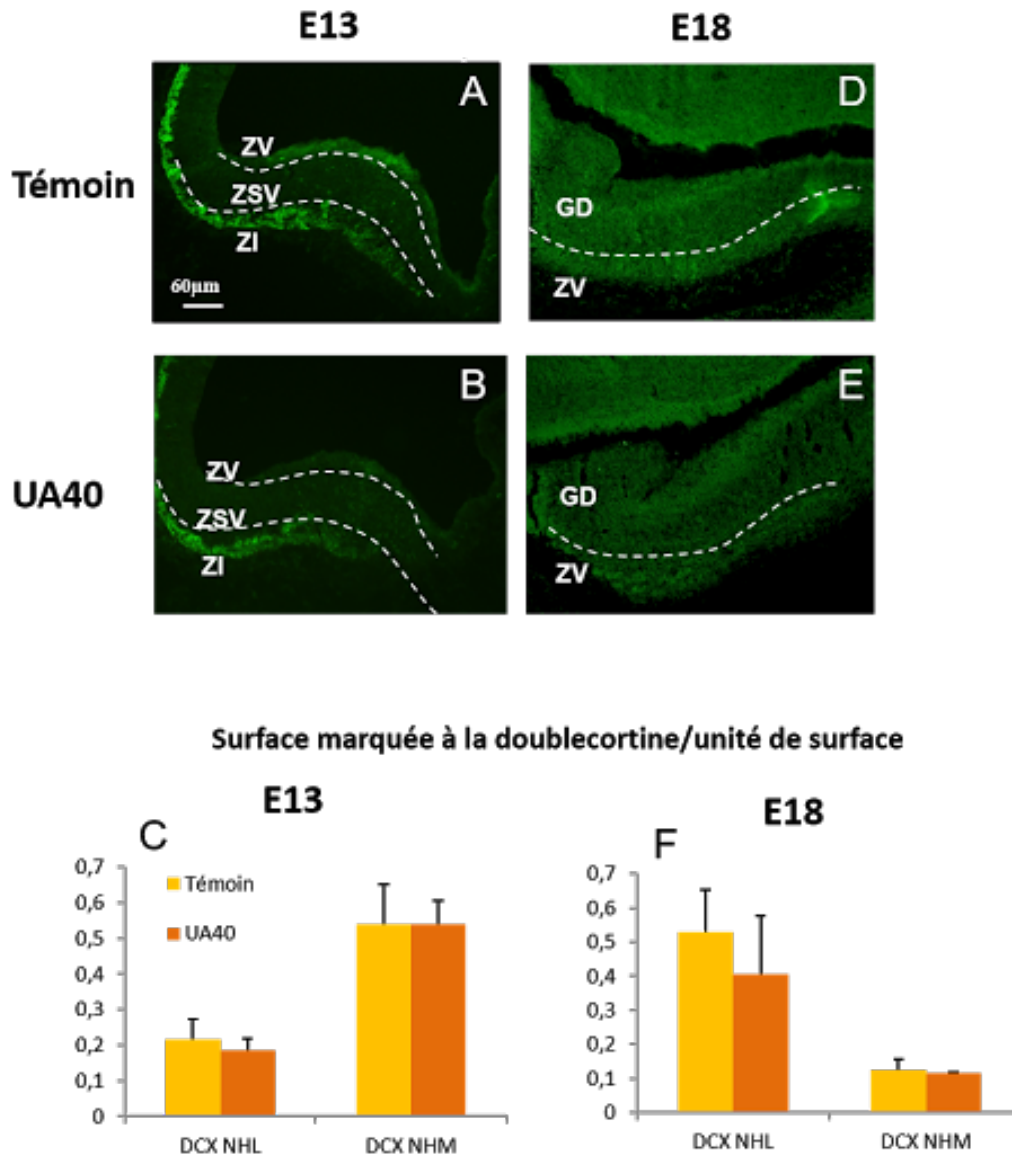


FIGURE 28 – Marquage immunohistochimique de la doublecortine aux stades E13 et E18

A,B : Marquage de la doublecortine dans le neuroépithélium hippocampique des embryons témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L d'uranium. C : Quantification de la surface de la doublecortine marquée (surface de la doublecortine marquée/unité de surface) au niveau latéral et médian du neuroépithélium hippocampique des embryons témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. D,E : Marquage de la doublecortine dans la neuroépithélium hippocampique des fœtus témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L d'uranium. F : Quantification de la surface de la doublecortine marquée (surface de la doublecortine marquée/unité de surface) au niveau latéral et médian du neuroépithélium hippocampique des fœtus témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. UA : uranium appauvri, NHL : Neuroépithélium hippocampique latéral, NHM : Neuroépithélium hippocampique médian, ZV : zone ventriculaire zone, ZSV : zone sous ventriculaire, ZI : zone intermédiaire, GD : gyrus denté.

Une diminution du nombre de cellules exprimant la DCX est observée dans le gyrus denté des rats P5 exposés à l'uranium à 40 mg/L (GD : témoin : $1,69 \times 10^{-3} \pm 0,43 \times 10^{-3}$, UA40 : $1,29 \times 10^{-3} \pm 0,03 \times 10^{-3}$, $p < 0,05$) (figure 30), mais aucune modification n'est observée dans le gyrus denté des rats P0 (figure 30). Au stade P21, la DCX est localisée dans les corps cellulaires au niveau de la zone sous-

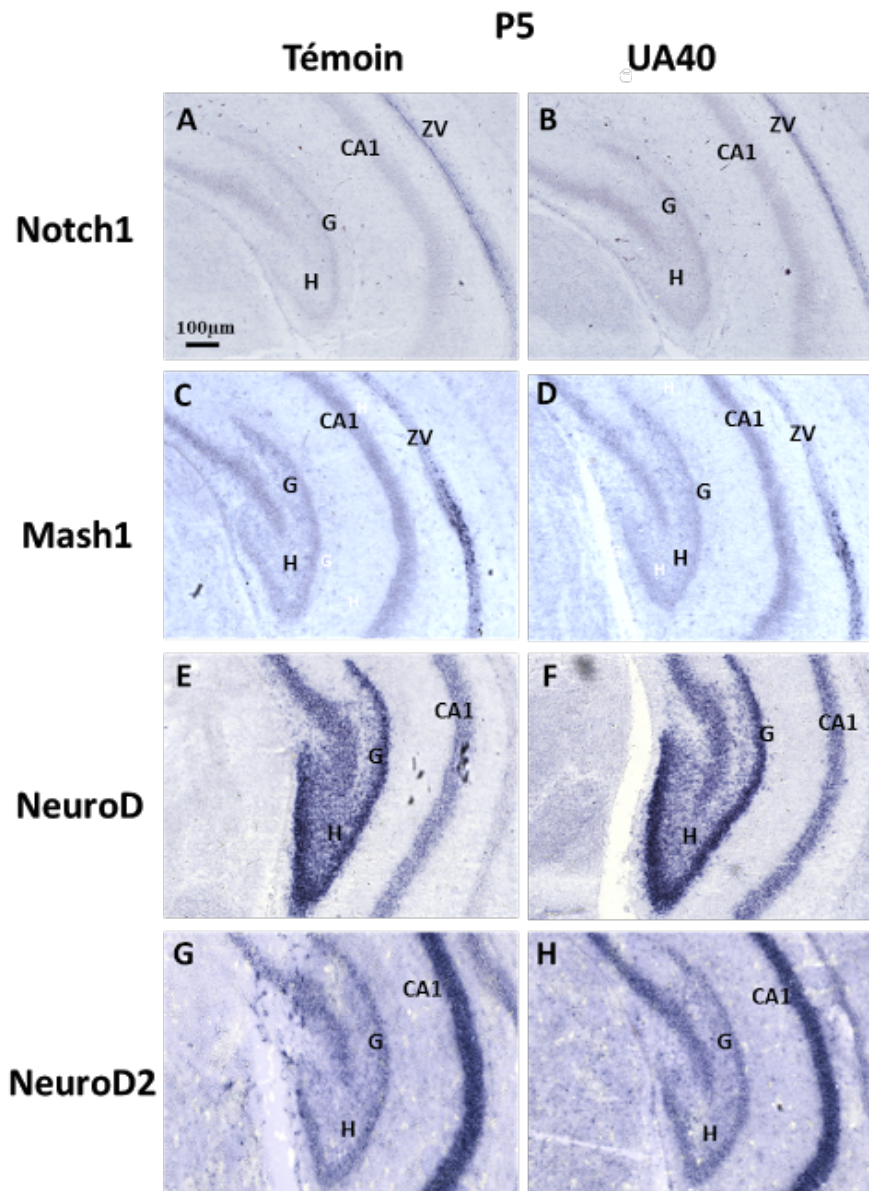


FIGURE 29 – Hybridation *in situ* des gènes Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 au stade P5

Expression de Notch1 (A,B), Mash1 (C,D), NeuroD (E,F) et NeuroD2 (G,H) dans le neuroépithélium hippocampique des rats P5 témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. UA : uranium appauvri, CA : corne d'Ammon, G : couche des cellules granulaires, H : hile.

granulaire et de la couche des cellules granulaires, dans les prolongements dendritiques au niveau de la couche moléculaire et dans les axones qui se prolongent vers la région CA3 dans le gyrus denté des rats témoins et exposés à 40 mg/L. L'analyse quantitative a révélé une augmentation du nombre de cellules dont la DCX est marquée dans le gyrus denté des rats exposés à 40 mg/L (GD : témoin : $1,20 \times 10^{-3} \pm 0,15 \times 10^{-3}$, UA40 : $1,57 \times 10^{-3} \pm 0,12 \times 10^{-3}$, $p < 0,05$) (figure 30).

En conclusion, suite à l'exposition à l'uranium à la concentration de 40 mg/L, aucune modification dans l'intensité d'expression du gène Wnt3a au stade E13 et des gènes Notch1, Mash1, NeuroD et

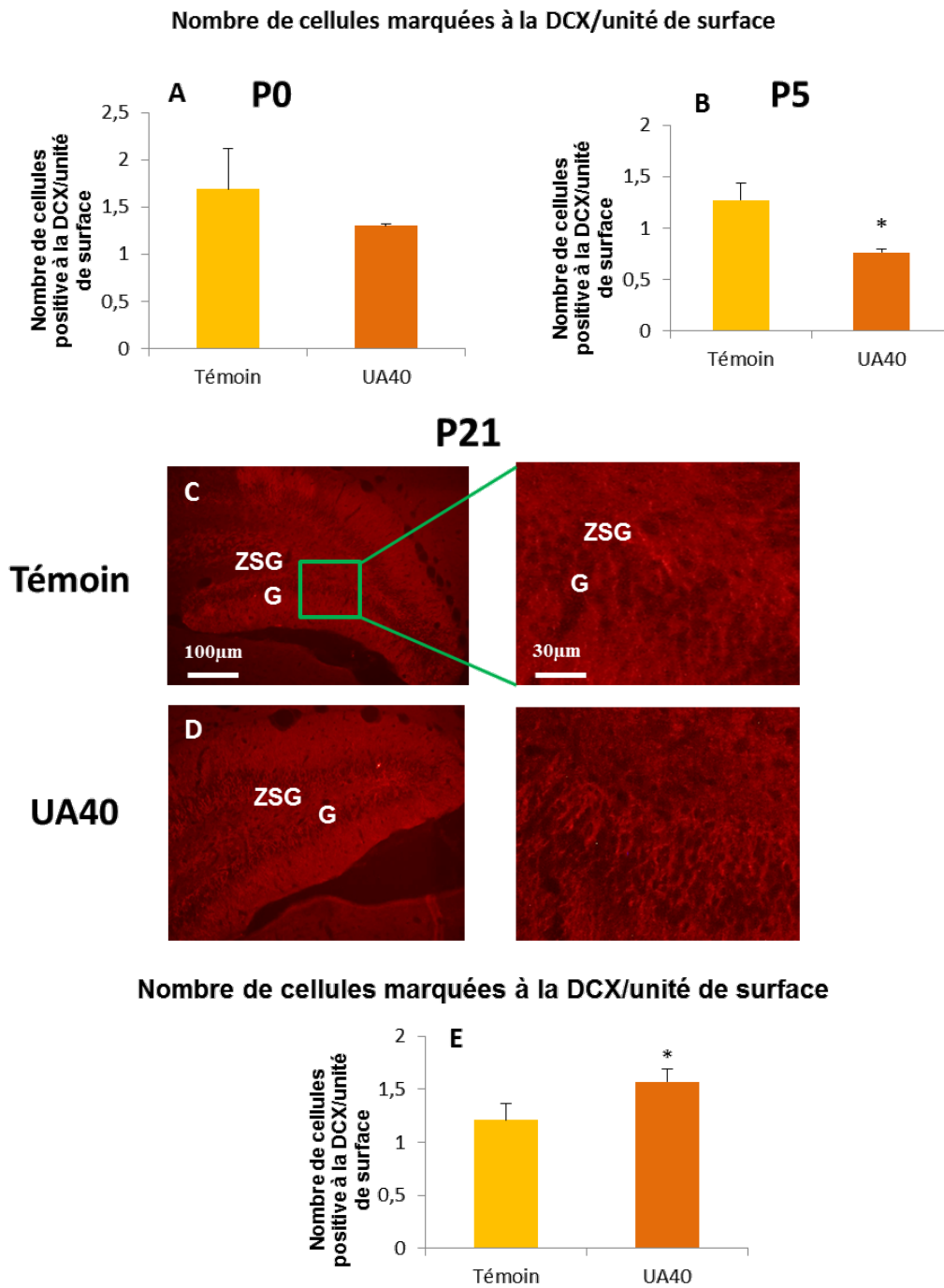


FIGURE 30 – Marquage immunohistochimique de la doublecortine aux stades P0, P5 et P21

A,B : Quantification de la surface de la doublecortine marquée (surface de la doublecortine marquée/unité de surface) au niveau du gyrus denté des rats P0 et P5 témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. C,D : Marquage immunohistochimique de la doublecortine dans le neuroépithélium hippocampique des rats P21 témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. E : Quantification de la surface de la doublecortine marquée (surface de la doublecortine marquée/unité de surface) de la couche des cellules granulaires et de la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe des rats P21 témoins et exposés à l'uranium à 40 mg/L. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm écart type. Le test statistique utilisé est le test de Student et la différence est significative si $*p < 0,05$. UA : uranium appauvri, DG : gyrus denté, G : couche des cellules granulaires, H : hile.

NeuroD2 n'a été observée aux stades E18 et P5. Les analyses immunohistochimiques n'ont pas mis en évidence de modification du marquage immunohistochimique de la DCX dans le neuroépithélium hippocampique des fœtus E18. De plus, une diminution du marquage immunohistochimique de la DCX au niveau du gyrus denté des rats P5 et une augmentation au niveau du gyrus denté des rats P21 exposés à l'uranium à 40 mg/L sont observés.

3.2.2.2.5 Étude du comportement des rats P21 exposés à l'uranium à 40 mg/L

Nos résultats ne montrent pas de modification dans les activités locomotrice, exploratrice ni dans la mémoire spatiale et la dépression des rats exposés à l'uranium à 40 mg/L.

3.2.2.3 Étude du processus de différenciation neuronale au niveau du neuroépithélium hippocampique après exposition à l'uranium à 120 mg/L et tests comportementaux

Nos analyses d'hybridation *in situ* par scoring ont mis en évidence une diminution de l'intensité d'expression du gène Wnt3a au niveau du neuroépithélium hippocampique des embryons exposés à l'uranium à 120 mg/L. Au stade E18, nos analyses ont montré une diminution d'intensité d'expression du gène Notch1 et une augmentation de l'intensité d'expression du gène Mash1 au niveau du neuroépithélium hippocampique des fœtus exposés à l'uranium à 120 mg/L. À ce stade, aucune modification n'a été observée en ce qui concerne l'expression du gène NeuroD (tableau 8). L'expression protéique de la nestine et de la doublecortine n'est pas modifiée dans le neuroépithélium hippocampique des embryons et fœtus exposés à l'uranium.

	Wnt3a (E13)	Notch1 (E18)	Mash1 (E18)	NeuroD (E18)	Notch1 (P5)	Mash1 (P5)	NeuroD (P5)	NeuroD2 (P5)
Témoins	+	+	+	+	+	+	+	+
UA120	-	-	++	+	+	+	+	+

TABLEAU 8 – Intensité d'expression des gènes impliqués dans la différenciation neuronale

Scoring de l'expression du gène Wnt3a dans le neuroépithélium hippocampique des embryons E13 et des gènes Notch1, Mash1 et NeuroD dans les neuroépithélia hippocampique et denté des fœtus E18 et des gènes Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 dans le gyrus denté des rats P5.

Au stade postnatal P5, l'expression des gènes Notch1, Mash1, NeuroD et NeuroD2 n'est pas modifiée suite à l'exposition à l'uranium dès le stade *in utero*. Le marquage immunohistochimique de la doublecortine au niveau du gyrus denté des rats P0 et P5 n'est pas modifié suite à l'exposition à l'uranium. En revanche, au stade P21, une augmentation de l'expression de la doublecortine a été observée au niveau du gyrus denté des rats exposés à l'uranium à 120 mg/L (témoin : $1,20 \times 10^{-3} \pm 0,15 \times 10^{-3}$, UA120 : $1,77 \times 10^{-3} \pm 0,08 \times 10^{-3}$, $p < 0,001$).

Au stade P21, les analyses des tests comportementaux réalisés montrent que l'état dépressif est augmenté (+75 %) chez les animaux exposés à l'uranium à 120 mg/L, sans modification des activités exploratrices et locomotrices ni de la mémoire spatiale.

En conclusion, nos résultats montrent que l'exposition à l'uranium à 120 mg/L pendant le développement cérébral entraîne des modifications dans l'expression de certains gènes impliqués dans le processus de différenciation neuronale, principalement aux stades prénatals. En effet, l'intensité d'expression du gène *Wnt3a* est diminuée dans le neuroépithélium hippocampique des embryons E13 exposés à l'uranium. De plus, une diminution dans l'intensité d'expression du gène *Notch1*, ainsi qu'une augmentation dans l'intensité d'expression du gène *Mash1*, au niveau des neuroépithélia hippocampique et denté des fœtus E18 ont été observées, sans modifications dans l'expression des gènes *NeuroD* et *NeuroD2*. Au stade P5, aucune modification dans l'expression de ces gènes n'a été mise en évidence. Enfin, les analyses immunohistochimiques ont révélé une augmentation du nombre de cellules dont la doublecortine (DCX) est marquée dans le gyrus denté des rat P21, sans modifications aux autres stades.

Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring (en cours de soumission).

Legrand M, Lam S, Anselme I, Gloaguen C, Ibanez C, Eriksson P,
Lestaevel P, Dinocourt C

Résultats : article « Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring »

Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depressive-like behavior in offspring

M. Legrand^a, S. Lam^a, I. Anselme^b, C. Gloaguen^a, C. Ibanez^a

P. Eriksson^c, P. Lestaevel^a, and C. Dinocourt^a

^aLaboratoire de RadioToxicologie Expérimentale, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, B.P.17, 92262 Fontenay aux Roses Cedex France

^bSorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR7622, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS)-Developmental Biology Laboratory, UMR7622, INSERM, 7 quai Saint Bernard, 75 252 PARIS CEDEX

^cDepartment of Environmental Toxicology, Uppsala University, Norbyvägen 18 A, 752 36 Uppsala, Sweden

M. Legrand: legmarie@gmail.com

S. Lam : suzanne.lam92@gmail.com

I. Anselme : isabelle.anselme@upmc.fr

C.Gloaguen : celine.gloaguen@irsn.fr

C. Ibanez: chrystelle.ibanez@irsn.fr

P. Eriksson: per.eriksson@ebc.uu.se

C. Dinocourt: celine.dinocourt@irsn.fr

Correspondence should be addressed to:

Philippe Lestaevel

Laboratoire de RadioToxicologie Expérimentale, Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, B.P.17, 92262 Fontenay aux Roses Cedex France

Tel: + 33 1 58 35 80 42, Fax: + 33 1 58 35 84 67

E-mail address: philippe.lestaevel@irsn.fr

ABSTRACT

The developing brain is known to be sensitive to uranium (U) and exposure to this element during postnatal brain development results in behavioral disorders in adulthood. Moreover, we have previously shown that U exposure during gestation and lactation affects neurogenesis, in particular neural cell proliferation and cell death. In this study, we investigated whether exposure to depleted U (DU) affects neuronal differentiation during prenatal and postnatal brain development. We assessed *in situ* expression of specific genes involved in neuronal differentiation and expression of neuronal protein markers. The effects of DU on neurobehavioral function were investigated in parallel. Neuronal differentiation involves many signaling pathways that regulate the balance between cell proliferation and the transition to neuronal differentiation. In the present study pregnant rats were exposed from gestational day (GD) 1 throughout lactation to postnatal day (PND) 21. Using *in situ* hybridization, our results show decreased expression of Wnt3a in the hippocampal neuroepithelium in embryos from GD 13 of DU exposed dams and decreased expression of Notch1 and increased expression of Mash1 in the hippocampal and dentate neuroepithelia of GD 18 fetuses of DU exposed dams. Expression of the NeuroD and NeuroD2 genes was not modified in the hippocampal neuroepithelium of GD18 fetuses of DU exposed dams. There was no change in the expression of any of these genes in the dentate gyrus in PND 5 pups from DU exposed dams. No change in nestin or doublecortin immuno-staining was observed in the prenatal or early postnatal stages. However, the number of doublecortin-positive cells increased in the granular cell layer of PND 21 pups of DU exposed dams. Finally, increased depressive-like behavior was observed in PND21 rats, without modification of locomotor and exploratory activities or of spatial memory. In conclusion, these results showed that exposure of pregnant and lactating rats to DU affects brain development by causing disturbed cell proliferation and neuronal differentiation at the prenatal stage, without changing terminal differentiation processes. Moreover, this exposure increased the pool of immature neurons in the dentate gyrus and depressive-like behavior in neonatal rats. Therefore, these data strongly suggest that exposure to DU during gestation and lactation affects brain development in embryos, fetuses and neonates with consequences for behavior in the offspring.

Key words: Neurogenesis, heavy metal, ontogenesis, behavior

1. Introduction

Neurogenesis is the process of new neuron formation which is involved in brain growth and is involved in behavior and cognitive functions in neurogenic areas of the adult brain (Deng *et al.*, 2010; Drapeau and Nora Abrous, 2008). In a previous study, we demonstrated that depleted-uranium (DU) exposure during gestation and lactation affects cell proliferation and cell death at specific prenatal and postnatal stages of development, mainly at the concentration of 120 mg/L DU (Legrand *et al.*, 2015). These disturbances might have an impact on the next steps of neurogenesis, like neuronal differentiation or migration and consequently on the fine organization of the neuronal network, which might disturb cerebral functions in adulthood.

Uranium (U) is a heavy metal naturally present in the environment at various concentrations. Anthropogenic uses of U lead to an increase of its concentration in the environment (Briner, 2010) and populations are exposed to U in underground water, essentially through food and drinking water. Chronic ingestion of U through drinking water may result in toxicity in many parts of the body including the brain (Craft *et al.*, 2004). In addition, it is well demonstrated that brain development is sensitive to U (for review see Dinocourt *et al.*, 2015), as already seen with other neurotoxic agents (Rice and Barone, 2000). Indeed, recent studies have shown impaired cognitive and emotional behavior in rats exposed to DU from birth to 2 months. The mechanisms underlying these behavioral effects are poorly understood. Nonetheless, decreased acetylcholine concentration and acetylcholinesterase activity and increased oxidative stress were noted after DU exposure from birth to 10 weeks (Lestaevel, et al., 2013; Lestaevel, et al., 2015). Preliminary results also suggest that adult neurophysiological properties in the hippocampus are impaired after DU exposure during postnatal development (Dinocourt et al., 2014; Dinocourt et al.2015).

The aim of our study was to determine whether DU exposure of rats during gestation and lactation affects neuronal differentiation and neurobehavior. Firstly, we investigated key genes expressed during neuronal differentiation. At the early stages of development, Wnt signaling is essential and more specifically the Wnt3a gene in the hippocampal development. Neuronal differentiation is regulated by

many pathways involving an important set of genes like Notch signaling genes and the pro-/anti-neurogenic bHLH (basic helix-loop-helix) genes. These bHLH genes are divided into two groups: those involved in neuronal determination, including the Notch1 and Mash1 genes, and those involved in neuronal differentiation, including the NeuroD and NeuroD2 genes. Consequently, we analyzed the expression of Wnt3a in the hippocampal neuroepithelium of GD13 embryos and the expression of the Notch1, Mash1 and NeuroD genes in hippocampal and dente neuroepithelia of GD18 fetuses, as from when neurons of the dentate gyrus begin to appear. In addition, most granular cells are generated during the first postnatal week, so the expression of Notch1, Mash1, NeuroD and NeuroD2 was examined in the dentate gyrus at postnatal stage PND5. Secondly, neuronal protein markers are also expressed during neurogenesis, like nestin, an intermediate filament protein found in stained stem cells and glial radial cells, and doublecortin, a microtubule-associated protein, in immature neurons (Pleasure *et al.*, 2000; von Bohlen und Halbach, 2011). Nestin-containing and doublecortin-containing cells by immunostaining were therefore analyzed at the prenatal and postnatal stages. Finally, animals were tested for locomotor activity, exploratory activity, spatial memory and depression -like behavior.

2. Materials and methods

2.1 Animals and contamination protocol

The contamination protocol has been previously published (Legrand *et al.*, 2015). Briefly, pregnant female Sprague-Dawley rats (Charles River, L'Arbresle, France) were exposed to DU (Areva-Cogema, France) in drinking water from the first day after mating (gestational day 1: GD1). We focused on animals exposed to 120 mg/L DU because modifications in cell death and cell proliferation were observed mainly at this concentration (Legrand *et al.*, 2015). The number of females was calculated with respect to the number of offspring needed for all experiments.

Pregnant females were divided into five time points during development: gestational day (GD) 13 (14 females), GD18 (12 females), postnatal day (PND) 0 (10 females), PND5 (10 females) and PND21 (28 females). Embryos, fetuses and pups were taken for analysis as follows: 42 embryos from 14 litters at

Résultats : article « Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring »

GD13, 33 fetuses from 12 litters at GD18, 20 male and female pups from 10 litters at PND0, 20 male and female pups from 10 litters at PND5 and 54 male pups from 28 litters at PND21.

All animal procedures were approved by the IRSN Animal Care Committee and were conducted in accordance with French legislation and European legal requirements (Decree 86/609/EEC) concerning the protection of animals used for experimental purposes. Scientists certified by the French Ministry of Agriculture performed all procedures in animals.

2.2 Tissue collection and preparation

For immunochemistry and *in situ* hybridization, embryos from GD13, fetuses from GD18 and brain from PND0, PND5 and PND21 were collected as previously described (Legrand et al., 2015). They were then embedded in Tissue-Tek OCT compound, frozen in a liquid nitrogen/isopentane mixture and kept at -80°C until use. Embryos and heads of fetuses were sagittally sectioned and brains of pups were coronally sectioned with a cryostat at a thickness of 10 µm or 20 µm. Brain sections were collected on superfrost slides and stored at -80°C until use.

2.3 In situ hybridization

Probe preparation: Probes were previously generated by polymerase chain reaction (PCR) by David and Wedlich (2001) (David and Wedlich, 2001). RNA probes were then *in vitro* transcribed using the DIG RNA labeling kit (Roche) according to the manufacturer's protocol.

	Primers	Sequences
NeuroD2	NeuroD2-F	CCAAACGCCTTCACCCTAACAC
	NeuroD2-RT7	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGGACAAGGGTAAGGCTGT
Notch 1	Notch 1-F	CCTCTCCACCAATACCTTGTC
	Notch 1-RT7	TAATACGACTCACTATAGGTCTTCAAGTCCACACTGGTGGT
Mash 1	Mash 1 F	CCAAACGCCTTCACCCTAACAC
	Mash 1 RT7	TAATACGACTCACTATAGGGCCACTTTGCGTTTGGACAGTA
NeuroD	NeuroD1 F	TACCTGTGACCTTCCCATGCT
	NeuroD1 RT7	TAATACGACTCACTATAGGGACGTTGATCCTCCTCGCTACA

Protocol: Embryo and brain sections were washed in PBS (phosphate buffered saline) 1X and pretreated with proteinase K and 4% paraformaldehyde (PFA) before incubation in prehybridization solution for 2 hours at RT. Then, sections were incubated overnight at 65°C with digoxigenin-labeled probes diluted

Résultats : article « Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring »

in prehybridization solution (1:100). After hybridization, slices were washed in 50% formamide-1XSSC (saline sodium citrate) and maleate buffer and pre-incubated in blocking solution containing 20% sheep serum, 2% blocking reagent and maleate buffer for 2 hours at RT. Then, slices were incubated in anti-digoxigenin AP (alkaline phosphatase) (1/3000, Roche Diagnostic, Meylan, France) overnight at 4°C. After washing in NTMT solution (100 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Tween), slices were revealed with a solution containing NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) reagent. Slices were then rinsed in PBS 1X and mounted using Prolong anti-fade gold reagent medium (Roche, France).

Analyses were performed in hippocampal and dentate neuroepithelia of embryos and fetuses and in dentate gyrus of PND5 pups by two investigators who were blind to the experimental group treatment. Analyses were processed by scoring to compare controls and the DU-exposed group. Briefly, we analyzed all slices from the control group that we scored as “+” and then randomly compared slices from both control and exposed groups and scored as “-” or “++” according to the gradient of staining intensity.

2.4 Immunohistochemistry

Brain sections from embryo, fetus and pups were rehydrated in PBS and incubated for one hour in a blocking solution containing 5% donkey serum (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in PBS-T (PBS containing 0.3% Triton) at RT. Then they were incubated with anti-nestin (GD13, GD18; 1:200, Millipore, Guyancourt, France) or anti-doublecortin antibodies (PND0, PND5, PND21; 1:200, Cell signaling, France) and with anti-NeuN antibodies (1:200, Millipore, France) overnight at 4°C. Slices were washed in PBS 1X and incubated for two hours at RT with Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit antibodies diluted in PBS-T (1:200, Jackson Immunoresearch, France) and in Cya3-conjugated donkey anti-mouse antibodies (1:200, Millipore, France). Slices were finally washed and mounted using Vectashield Dapi-containing medium.

Slices were analyzed with a fluorescence microscope (Zeiss, Axiophot, Germany). Histolab software (Microvision Instruments, Evry, France) was used to quantify the staining.

Analyses were performed in hippocampal and dentate neuroepithelia of brains from embryos from GD13 and fetuses from GD18 and in the DG of hippocampus of pups from PND0 and PND5 by an investigator who was blind to the experimental group treatment. At PND21, analyses were focused on the granular cell layer of the DG. Embryos from GD 13 and fetuses from GD 18 the ratio of the DCX-stained area was measured as well as and the ratio of the nestin-stained area to the total area of the hippocampal and dentate neuroepithelia. At the postnatal stages, we measured the number of DCX-positive cells/mm² in the granular cell layer and in the tertiary matrix of the DG in PND0 and PND5 pups and in the granular cell layer and subgranular zone of the DG in PND21 rats. For each developmental stage, DU-exposed animals were compared with controls. All analyses were performed by two investigators who were blind to the experimental group treatment.

2.5 Behavioral tasks

Behavioral tests were performed on PND21 male pups (n=16) to explore locomotor activity, exploratory activity, spatial memory and depression-like behavior. Behavioral tasks were performed in a room with constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) and light conditions (60-W light). No test required food deprivation, reward, or punishment. The tests were recorded by a video camera and were read by a trained observer unaware of the exposure conditions.

-Locomotor and exploratory activities

Locomotor and exploratory activities were assessed with an open-field test, already described by Prut and Belzung (2003)(Prut and Belzung, 2003). Briefly, rats were moved to the center of an open-field (45 cm × 45 cm), equipped with invisible infrared beams, with lines every 2.5 cm and one line 16 cm high, monitored by an automated activity-monitoring system (Bioseb, Vitrolles, France). Counting occurred when the rat moved horizontally, showing predominantly locomotor activity, or vertically (rearing), showing exploratory activity (Rocha and de Mello, 1994). The numbers of horizontal and rearing movements were recorded during a 20-min period.

-Spatial memory

Spatial working memory was assessed in a Y-maze made with three arms (70 cm in length, 50 cm in height, 10 cm wide at the bottom, and 20 cm wide at the top) that converged at equal angles. Rats were placed at the center of the maze and allowed to move freely for a ten-minute test session. The sequence and number of arm visits were manually recorded. Alternation was defined as consecutive entry into each of the three different arms (Pothion *et al.*, 2004).

-Depression-like behavior

The forced swimming test was performed to study depressive-like behavior. Rats were individually placed in a glass cylinder (height 60 cm, diameter 40 cm) containing enough water so the hind legs could not reach the bottom of the cylinder but the tail could. The water was maintained at 23-25°C and the rats were left for 10 min. Immobility was measured during the last 5 min of the test. The animal was immobile when it floated in an upright position and made only minimal movements to keep its head above water (Bourin *et al.*, 2004).

2.6 Statistical analyses

Analyses were performed on 5 animals from different litters per group for *in situ* hybridization and immunochemistry. For behavior tests, 16 animals from different litters per group were studied. All results are graphically presented as means \pm standard deviation (SD). One-way ANOVA followed by Dunn's method or the Holm-Sidak method was used to compare the control and exposed groups. Differences were considered statistically significant for $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using Sigmaplot software (Systat software, Paris, France) by using standard deviation.

3. Results

3.1 Effects of DU on neuronal differentiation at prenatal stages

In situ hybridization was performed to study the pattern of genes involved in neuronal differentiation and immunohistochemistry to study the pattern of neuronal protein markers. We compared lateral and medial levels of control and exposed embryos and fetuses.

Cells expressing Wnt3a are localized mainly in the hippocampal neuroepithelium in GD13 embryos from both DU exposed and control dams. Analysis by scoring showed a decrease in the gradient of staining intensity of Wnt3a in GD13 embryos of exposed dams (Fig. 1A-B). In GD18 fetuses of exposed dams, Notch1 was expressed homogeneously in all cells in the VZ of the hippocampal and dentate neuroepithelia for both control and DU-exposed groups. However, the gradient of staining intensity was less intense in the hippocampal and dentate neuroepithelia of GD18 fetuses of exposed dams compared with the control group (Fig. 2A-B). Mash 1 was expressed in cells localized in the VZ of hippocampal and dentate neuroepithelia in GD18 fetuses of exposed dams. In exposed fetuses, the distribution pattern of Mash1 was similar to that of the control, but the gradient of staining intensity was more intense in hippocampal and dentate neuroepithelia (Fig. 2C-D). At this developmental stage, NeuroD was expressed in neurons of the hippocampal plate for both control and exposed fetuses. No modification in the gradient of staining intensity was observed between GD18 fetuses of exposed dams compared with controls (Fig. 2E-F).

In GD13 embryos of exposed dams, nestin-positive cells were localized in the VZ and nestin-positive fibers in the SVZ and in the intermediate zone (IZ) of the hippocampal neuroepithelium for both control and DU-exposed embryos (Figs. 3A-B). No modification in the nestin-positive area to total area ratio was observed in the hippocampal neuroepithelium between GD13 embryos of control and GD13 embryos of exposed dams (Fig. 3C).

In the hippocampal and dentate neuroepithelia of GD18 fetuses, nestin-positive cells were localized in the VZ and nestin-positive fibers were found in the SVZ. The pattern of nestin distribution was similar in GD18 fetuses from control and DU-exposed dams (Figs. 3D-E). The ratio between nestin-positive

area and total area was not modified in exposed group in the hippocampal neuroepithelium, compared with the control group (Fig. 3F)

In GD13 embryos and GD18 fetuses, DCX staining was found in the cell body and neurite outgrowth of immature neurons. DCX-positive cells were distributed mainly in the IZ of hippocampal neuroepithelium, but few neuronal progenitors were stained in the SVZ in embryos of both the control and DU-exposed groups (Figs. 4A-B). No significant change in DCX-positive area was observed in the hippocampal neuroepithelium of embryos from dams exposed to 120 mg/L DU (Fig.4C).

In GD18 fetuses, DCX-positive cells were localized in the SVZ, IZ of the hippocampal and dentate neuroepithelia of control and exposed groups. (Figs. 4D-E). Quantitative analysis of DCX-positive area to total area showed no significant change between GD18 fetuses of exposed dams and controls (Fig. 4F).

3.2 Effects of DU on neuronal differentiation during neonatal and postnatal brain development

At the developmental stage PND5, we focused on the dentate gyrus. Notch1-expressing cells were confined in the VZ of the neuroepithelium and in cells in the migratory pathway (Figs. 5A-B). Mash1 was mainly expressed in dentate precursors located in the tertiary matrix. Cells in the migratory pathway continued to express Mash1 at this stage (Figs. 5C-D). NeuroD was expressed throughout the tertiary matrix in newborn granule cells and in cells in the migratory pathway (Figs 5E-F). Finally, NeuroD2 was expressed in cells only localized in the granular cell layer (Figs 5G-H). No difference in the pattern of expression of these four genes in the DG was observed between exposed and non-exposed PND5 pups. Moreover, the gradient of staining intensity analyzed by scoring was similar in control and exposed PND5 pups in the dentate gyrus of PND5 control pups compared with the control group.

In the dentate gyrus of PND0 and PND5 pups, DCX staining was found in the cell body and in growing dendrites of newborn granule cells. DCX-positive cells were localized in the tertiary matrix and their distribution was similar in control and exposed pups. No change in the number of cells stained with DCX was observed in PND0 and PND5 exposed pups compared with controls (Figs. 6 A-B). In the DG of PND21, DCX staining was localized in the cell body, dendrites and axons in the subgranular zone

(SGZ) and granule cell layer. Quantitative analysis showed a significant increase in the number of DCX-positive cells in PND21 rats exposed to 120 mg/L DU (control: $1.2 \times 10^{-3} \pm 0.15 \times 10^{-3} \text{mm}^2$, DU120: $1.78 \times 10^{-3} \pm 0.08 \times 10^{-3} \text{mm}^2$, $p < 0.01$) (Figs. 6 C-D).

3.3 Effects of DU on rat behavior

Behavioral tests were performed on PND21 old rats from dams exposed to DU from GD1 to PND21. We explored the locomotor and exploratory activity of rats by counting the total number of lines crossed and the total number of rearing movements in the open field. No significant difference was seen between PND21 rat pups from the DU-exposed dams and its control (Fig. 7A-B).

To assess spatial memory, we measured the number of arm entries and the percentage alternation in the Y-maze. No significant difference was seen between PND21 rat pups from the DU-exposed dams and its control (Fig. 7C).

Depression-like behavior assessed by measuring the forced swimming test showed that immobility during the last 5 min of the test increased significantly in the group exposed to 120 mg/L compared with the control group (+75%, $p < 0.05$), (Fig. 7D).

4. Discussion

During brain development, neuronal differentiation is a key stage of neurogenesis, which is regulated by many cell signaling pathways. Neurogenesis requires the upregulation of proneuronal genes and downregulation of non-neuronal genes to maintain timing of differentiation and the correct number of neurons. Thus, a disturbance in neuronal differentiation could affect brain growth and disturb cerebral function in adulthood. In a previous study, we demonstrated that exposure to DU disturbed neurogenesis, in particular cell proliferation and cell death (Legrand, et al., 2015). In the present study, we showed that DU can also cause alterations in the process of neuronal differentiation and migration during brain development and impaired depressive-like behavior in young rats.

4.1 Changes of gene expression, involved in neuronal differentiation, in embryos (GD13), fetuses (GD18) and pups (PND5) after DU exposure of dams from GD1 to PND21

We first explored the patterns of expression of specific genes that are likely to govern neuronal differentiation. *Wnt3a* was expressed in the hippocampal neuroepithelium, which will be the future hippocampus during early hippocampal development. Our results showed a decrease in the pattern of staining intensity of *Wnt3a* in the hippocampal neuroepithelium of GD13 embryos of exposed dams. *Wnt3a* is known to be crucial for the regulation of hippocampal development and is involved in maintaining neural progenitor cell proliferation (Lee *et al.*, 2000). Consequently, its decreased expression could affect cell proliferation in the next stages of development, as demonstrated in our previous study (Legrand, et al., 2015).

We also examined the patterns of expression of *Notch1*, *Mash1*, *NeuroD* and *NeuroD2* during hippocampal and dentate gyrus development. *Notch1* and *Mash1* were prenatally expressed in the VZ of the hippocampal and dentate neuroepithelia at prenatal stages. During the first postnatal weeks, *Notch1* was expressed in the VZ of the neuroepithelium and in the migratory pathway, whereas *Mash1* was mainly expressed in dentate precursors located in the tertiary matrix. Our results showed that the pattern of staining intensity was decreased for *Notch1* and increased for *Mash1* in the hippocampal neuroepithelium of GD18 fetuses of DU-exposed dams. In the dentate gyrus of PND5 rats, no difference in the expression of *Notch1* and *Mash1* was observed between control and exposed pups. Both of these genes are involved in cell proliferation and neuronal determination. Low levels of *Notch1* promote proliferation, whereas high levels lead to neuronal differentiation at the prenatal and postnatal stages (Guentchev and McKay, 2006). During prenatal development, *Mash1* also promotes progenitor division, whereas at the postnatal stage it promotes neuronal differentiation (Castro *et al.*, 2011). We therefore hypothesized that exposure to DU during gestation inhibits the transition to the neuronal differentiation pathway and promotes neural cell proliferation during prenatal development. According to this, we already described that DU exposure could act on cell proliferation by increasing the production of dividing neural progenitors at GD18 (Legrand, et al., 2015). However, this effect was not observed in the dentate gyrus at the postnatal stage. Terminal differentiation is regulated by *NeuroD* and *NeuroD2*

genes. NeuroD is expressed in differentiating neurons, whereas NeuroD2 is expressed in mature neurons. No difference in the expression of NeuroD and NeuroD2 was observed in GD18 fetuses and PND5 pups between the exposed and control groups. These results suggest that DU has no impact in cells already undergoing neuronal differentiation.

Finally, we examined neuronal differentiation by studying the expression of nestin and DCX, which are neuronal protein markers. Our results showed no modification in nestin and DCX staining in the hippocampal and dentate neuroepithelium of GD13 embryos and GD18 fetuses or in the dentate gyrus of PND0 and PND5 pups from the DU-exposed groups.

Despite changes in the expression of genes involved in neuronal differentiation during prenatal development, no major impact on the morphology of the hippocampus and dentate gyrus was observed at the late postnatal stage (Legrand, et al., 2015). Many signaling pathways are involved during the formation of the hippocampus and the dentate gyrus, especially in the initial neuronal determination. These could counterbalance each other when one gene signaling pathway is defective, thereby allowing proper development of this brain region.

4.2 Impaired depressive-like behavior and increased DCX-containing immature neurons in the dentate gyrus of exposed PND21 rats

During the postnatal development, we focused on neuronal differentiation by staining immature neurons in the dentate gyrus that contain DCX, a microtubule-associated protein involved in neuronal migration (Tanaka *et al.*, 2004). An increase in the number of DCX-positive cells was observed in the granular cell layer in PND21 rats of exposed dams. Previously, an increase in the number of neuronal marker Tuj1-positive cells has been reported in the dentate gyrus of rats after postnatal lead exposure (Jaako-Movits *et al.*, 2005). The authors explain this increase in the number of immature neurons as a delay in the transition of post-mitotic neurons into mature neurons, which may also explain the increase in DCX-positive cells observed in our DU-exposed animals.

Accumulation of immature neurons in the dentate gyrus might lead to an increase in neuronal migration, establishment of inappropriate synaptic contacts and thus disorders in the neural network that could affect its neurophysiological properties and neurobehavior. In our study, no modification of locomotor activity, exploratory activity or spatial memory was observed in PND21 rats from dams exposed to DU from gestation to weaning. However, the forced swimming test showed that immobility time, a sign of depressive-like behavior, increased significantly in these exposed animals. Such behavioral impairment has already been described in adult rats after DU exposure beginning at birth (Lestaevel, et al., 2015). Adult hippocampal neurogenesis and depressive-like behavior are known to be related, but the precise mechanisms are not fully elucidated (Sahay and Hen, 2007). For example, BrdU-positive cells as well as DCX-containing cells are decreased in a depressive rat models (Lin and Wang, 2014; Roni and Rahman, 2015). Therefore, the observed impaired depressive-like behavior could be associated with changes in neurogenesis related to developmental DU exposure, even if other mechanisms are involved (Dinocourt, et al., 2015; Lestaevel, et al., 2015).

Conclusion

In conclusion, our results show that DU exposure during gestation and lactation may affect neurogenesis. Prenatal DU exposure disturbed neural cell proliferation and early neuronal determination or induction without affecting terminal differentiation in the prenatal and postnatal stages. DU exposure during brain development also disturbed hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus and increased depressive-like behavior in postnatal rats. These data confirm that brain development is sensitive to exposure to DU, which may constitute a health risk in vulnerable populations.

Résultats : article « Exposure to depleted uranium during development affects neuronal differentiation in the hippocampal dentate gyrus and impairs depression-like behavior in offspring »

FUNDING INFORMATION

This study was part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety (IRSN) and European DoReMi program (Low Dose Research towards Multidisciplinary integration).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sylvie Schneider for her expertise in *in situ* hybridization and Frederic Voyer, Thierry Loiseau and Jean-Michel Guischet for animal care.

REFERENCES

- Bourin, M., Mocaer, E., and Porsolt, R. (2004). Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* **29**(2), 126-33.
- Briner, W. (2010). The toxicity of depleted uranium. *International journal of environmental research and public health* **7**(1), 303-13.
- Castro, D. S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L. G., Hunt, C., Dolle, D., Bithell, A., Ettwiller, L., Buckley, N., and Guillemot, F. (2011). A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes & development* **25**(9), 930-45.
- Craft, E., Abu-Qare, A., Flaherty, M., Garofolo, M., Rincavage, H., and Abou-Donia, M. (2004). Depleted and natural uranium: chemistry and toxicological effects. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* **7**(4), 297-317.
- David, R., and Wedlich, D. (2001). PCR-based RNA probes: a quick and sensitive method to improve whole mount embryo in situ hybridizations. *BioTechniques* **30**(4), 769-72, 74.
- Deng, W., Aimone, J. B., and Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews. Neuroscience* **11**(5), 339-50.
- Dinocourt C., Stefani J., Elie C., Lestaevel P., Dublineau I., Gourmelon P., 2014. Reduced carbachol-induced beta/gamma oscillations in CA3 region of hippocampus after post-natal contamination of uranium in adult rat. Meeting abstract, Neurosciences 2014. Washington, D.C.
- Dinocourt, C., Legrand, M., Dublineau, I., and Lestaevel, P. (2015). The neurotoxicology of uranium. *Toxicology* **337**, 58-71.
- Drapeau, E., and Nora Abrous, D. (2008). Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging cell* **7**(4), 569-89.
- Guentchev, M., and McKay, R. D. (2006). Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner. *The European journal of neuroscience* **23**(9), 2289-96.
- Houpert, P., Frelon, S., Lestaevel, P., Bussy, C., Gourmelon, P., and Paquet, F. (2007). Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology* **28**(1), 108-13.
- Jaako-Movits, K., Zharkovsky, T., Romantchik, O., Jurgenson, M., Merisalu, E., Heidmets, L. T., and Zharkovsky, A. (2005). Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **23**(7), 627-35.
- Lee, S. M., Tole, S., Grove, E., and McMahon, A. P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* **127**(3), 457-67.
- Legrand, M., Elie, C., Stefani, J., Flores, N., Culeux, C., Delissen, O., Ibanez, C., Lestaevel, P., Eriksson, P., and Dinocourt, C. (2015). Cell proliferation and cell death are disturbed during prenatal and postnatal brain development after uranium exposure. *Neurotoxicology* **52**, 34-45.
- Lestaevel, P., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Vacher, C. M., Dublineau, I., Voisin, P., and Taouis, M. (2013). Cerebral cortex and hippocampus respond differently after post-natal exposure to uranium. *The Journal of toxicological sciences* **38**(5), 803-11.
- Lestaevel, P., Dhieux, B., Delissen, O., Benderitter, M., and Aigueperse, J. (2015). Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth. *The Journal of toxicological sciences* **40**(1), 99-107.
- Lin, Y. L., and Wang, S. (2014). Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behavioural brain research* **259**, 24-34.
- Pleasure, S. J., Collins, A. E., and Lowenstein, D. H. (2000). Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(16), 6095-105.
- Pothion, S., Bizot, J. C., Trovero, F., and Belzung, C. (2004). Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behavioural brain research* **155**(1), 135-46.

- Prut, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology* **463**(1-3), 3-33.
- Rice, D., and Barone, S., Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives* **108 Suppl 3**, 511-33.
- Rocha, J. B., and de Mello, C. F. (1994). Handling during suckling alters rat behavior but does not reverse the deleterious effects of undernutrition on naltrexone-induced inhibition of exploratory activity. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition* **64**(2), 152-6.
- Roni, M. A., and Rahman, S. (2015). The effects of lobeline on depression-like behavior and hippocampal cell proliferation following chronic stress in mice. *Neuroscience letters* **584**, 7-11.
- Sahay, A., and Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience* **10**(9), 1110-5.
- Tanaka, T., Serneo, F. F., Tseng, H. C., Kulkarni, A. B., Tsai, L. H., and Gleeson, J. G. (2004). Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* **41**(2), 215-27.
- von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell and tissue research* **345**(1), 1-19.

Figures

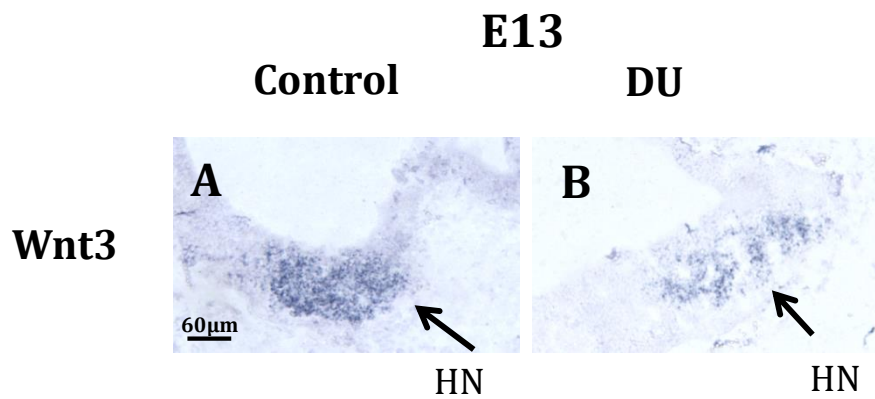


Fig 1: In situ hybridization of *Wnt3a* in *GD13* embryos. (A-B) *Wnt3a* expression in the hippocampal neuroepithelium of GD 13 embryos from control and DU (120 mg/l) exposed dams. HN: hippocampal neuroepithelium, DU: depleted uranium.

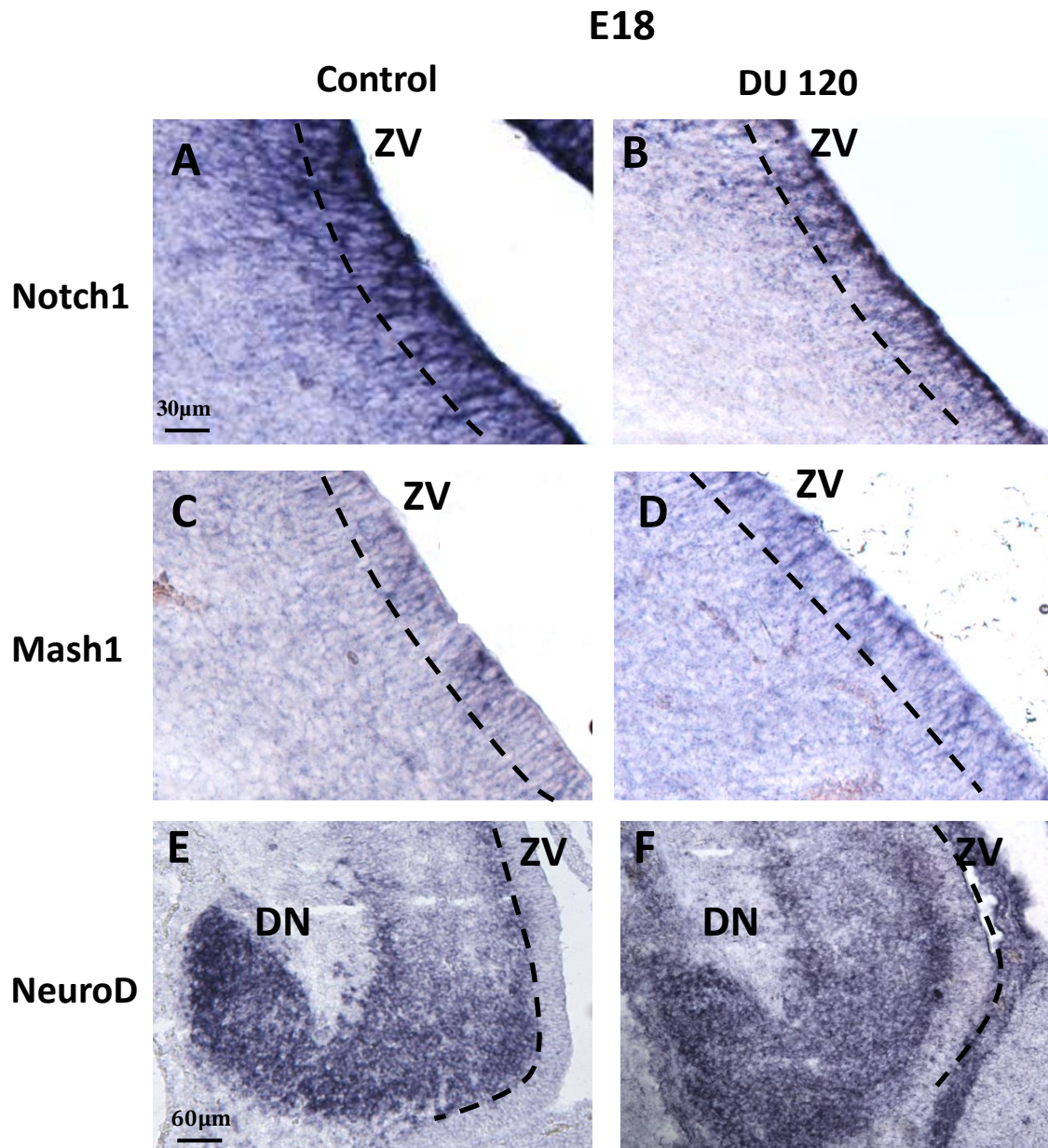


Fig 2: In situ hybridization of *Notch1*, *Mash1* and *NeuroD* in GD18 fetuses. (A-B) *Notch1* expression in the hippocampal neuroepithelium of GD 18 fetuses from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (C-D) *Mash1* expression in the hippocampal neuroepithelium of GD 18 fetuses from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (E-F) *NeuroD* expression in the hippocampal neuroepithelium of GD 18 fetuses from control and DU (120 mg/l) exposed dams. VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone, DU: depleted uranium.

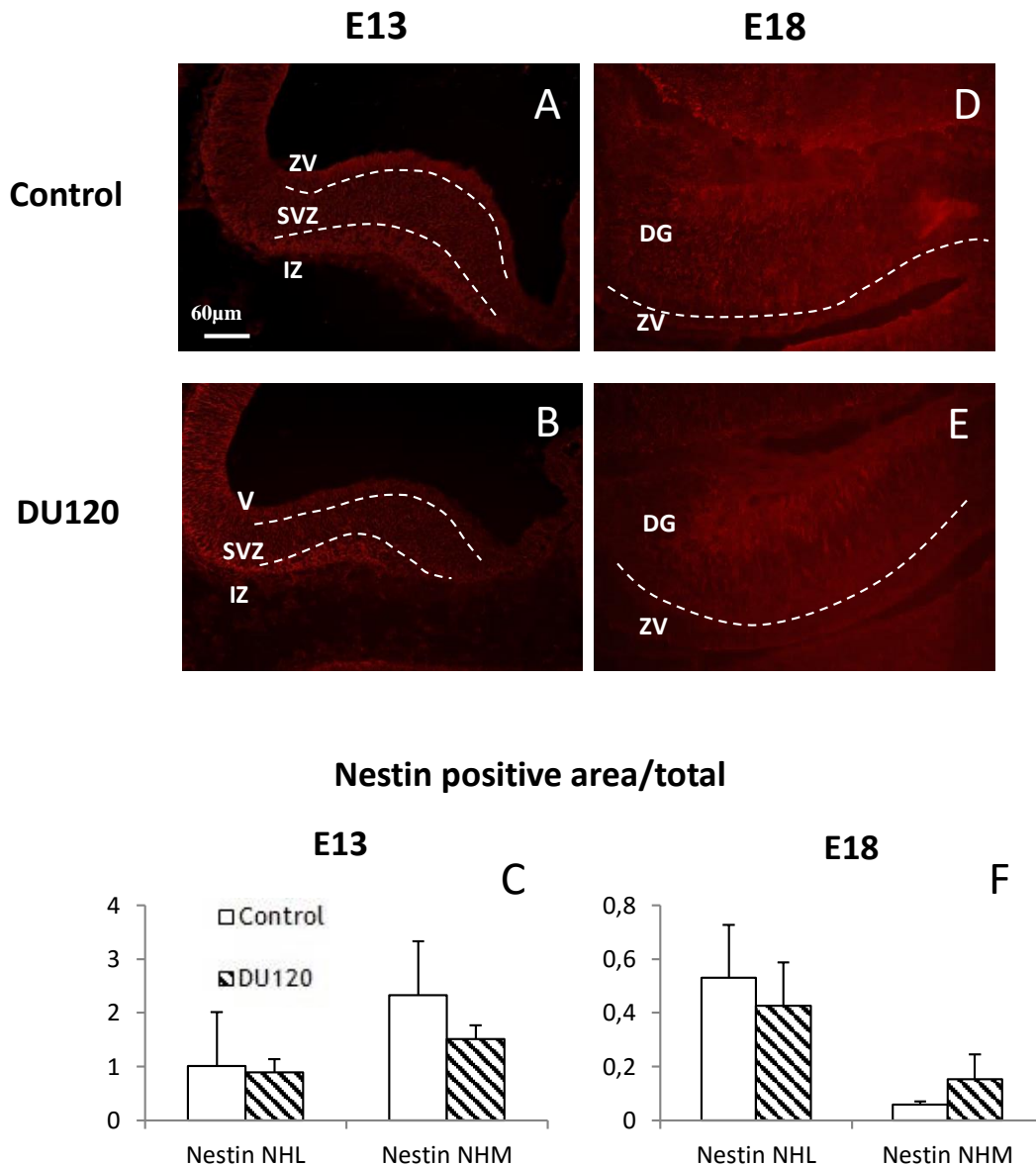


Fig 3: Expression of nestin in GD13 embryos and GD18 fetuses. (A-B) Expression of nestin in the hippocampal neuroepithelium of GD 13 embryos from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (C) Ratio of nestin-positive area to total area (nestin area/ 10^{-3} mm²) at the lateral and medial levels of the hippocampal neuroepithelium of control and exposed embryos. (D-E) Expression of nestin in the hippocampal neuroepithelium of GD 18 fetuses from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (F) Ratio of nestin-positive area to total area (nestin area/ 10^{-1} mm²) at the lateral and medial levels of the hippocampal neuroepithelium of control and exposed fetuses. DU: depleted uranium, HN: hippocampal neuroepithelium, DG: dentate gyrus, VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone, IZ: intermediate zone L: lateral, M: median.

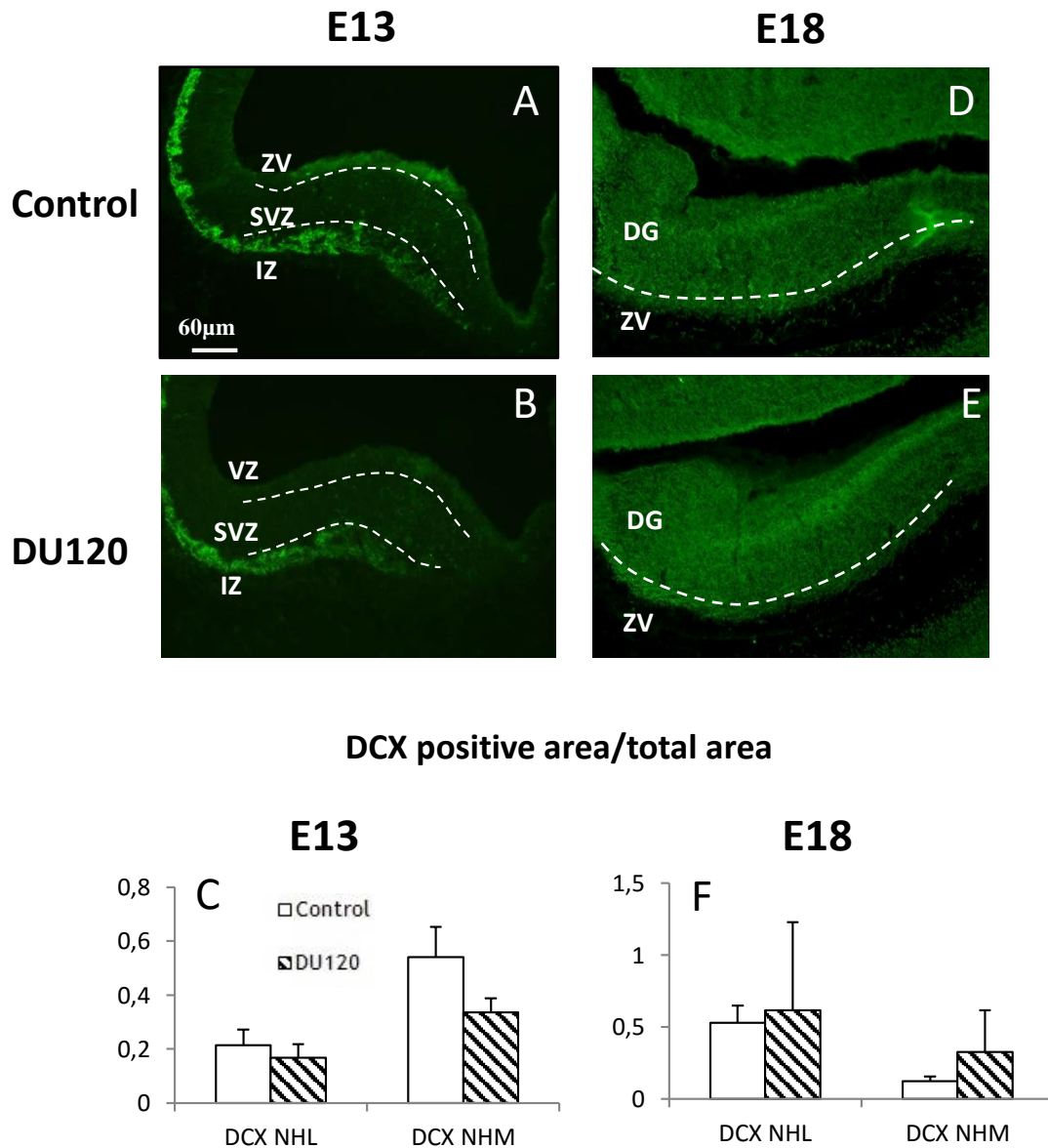


Fig 4: Expression of DCX in GD13 embryos and GD18 fetuses. (A-B) Expression of DCX in the hippocampal neuroepithelium of GD 13 embryos from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (C) Ratio of DCX-positive area to total area (DCX area/ 10^{-3} mm²) at the lateral and medial levels of the hippocampal neuroepithelium of control and exposed embryos. (D-E) Expression of DCX in the hippocampal neuroepithelium of GD 18 fetuses from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (F) Ratio of DCX-positive area to total area (DCX area/ 10^{-1} mm²) at the lateral and medial levels of the hippocampal neuroepithelium of control and exposed fetuses. DU: depleted uranium, HN: hippocampal neuroepithelium, DG: dentate gyrus, VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone, IZ: intermediate zone L: lateral, M: median.

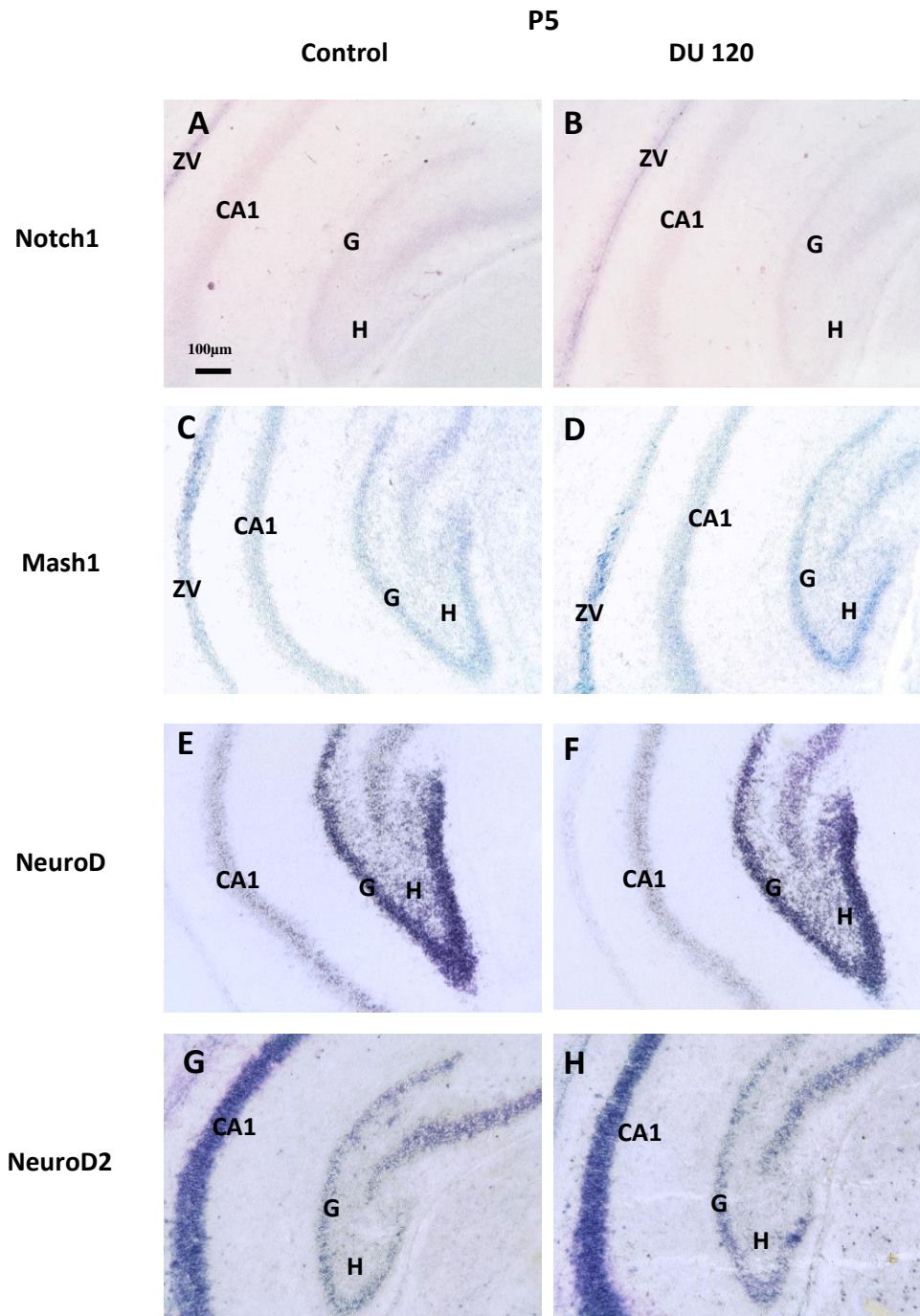


Fig 5: In situ hybridization of *Notch1*, *Mash1*, *NeuroD* and *NeuroD2* in PND5 pups. (A-B) *Notch1*, (C-D) *Mash1*, (E-F) *NeuroD*, (G-H) *NeuroD2* expression in the hippocampal neuroepithelium of pups from control and DU (120 mg/l) exposed dams, control (A-G), DU (B-H). VZ: ventricular zone, SVZ: subventricular zone, DU: depleted uranium.

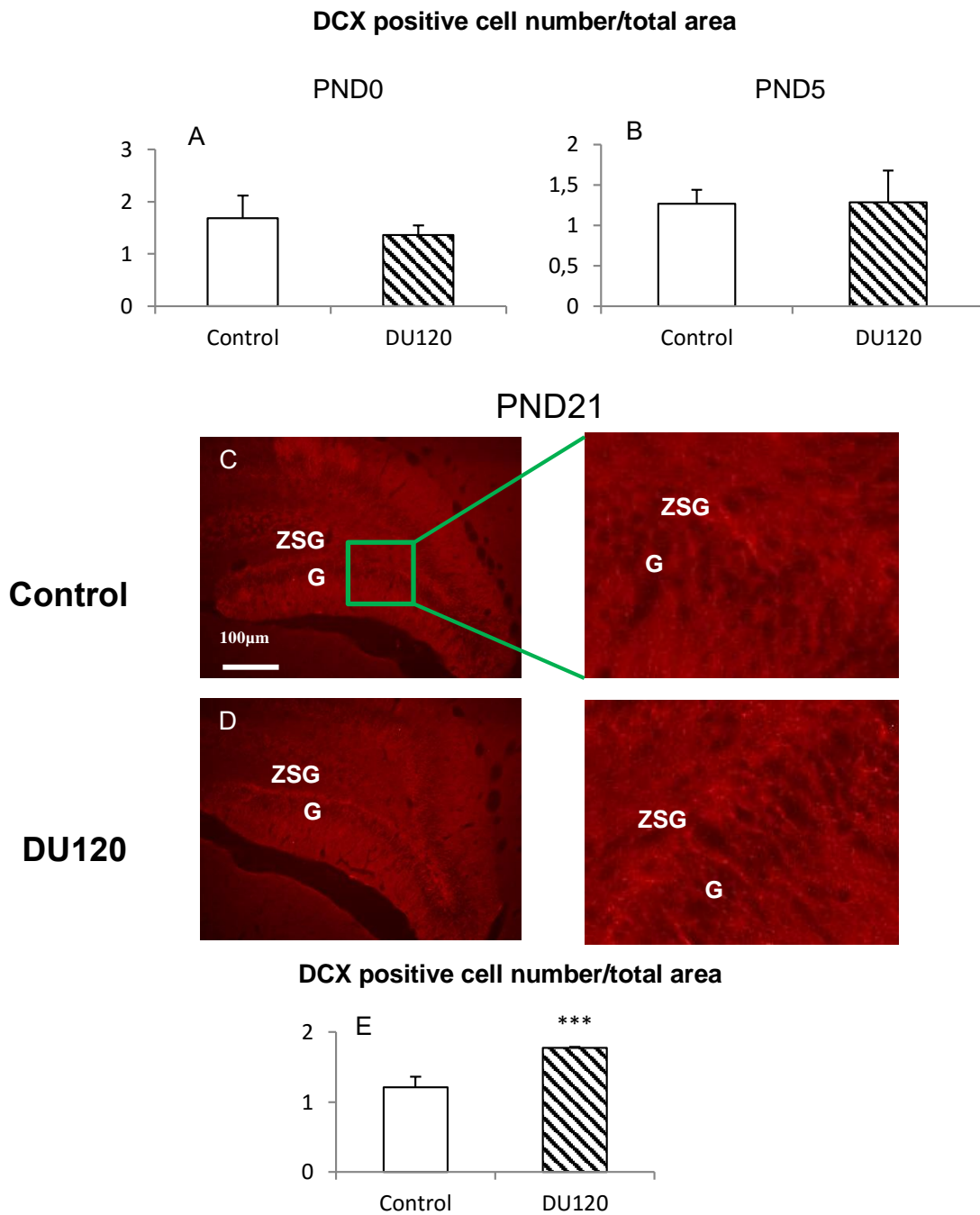


Fig 6: Expression of DCX in postnatal pups. (A-B) Ratio of DCX-positive cells to total area in the dentate gyrus of PND0 and PND5 of pups from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (C-D) Expression of DCX in the dentate gyrus of PND21 of pups from control and DU (120 mg/l) exposed dams. (E) Ratio of DCX-positive cells to total area in the dentate gyrus of pups from control and DU (120 mg/l) exposed dams. PND: postnatal day, DU: depleted uranium, H: hilus, G: granular zone, SGZ: subgranular zone, CA: Ammon's horn, DG: dentate gyrus. Asterisks indicate a significant difference between the exposed and control groups (one-way ANOVA, *** $p < 0.001$).

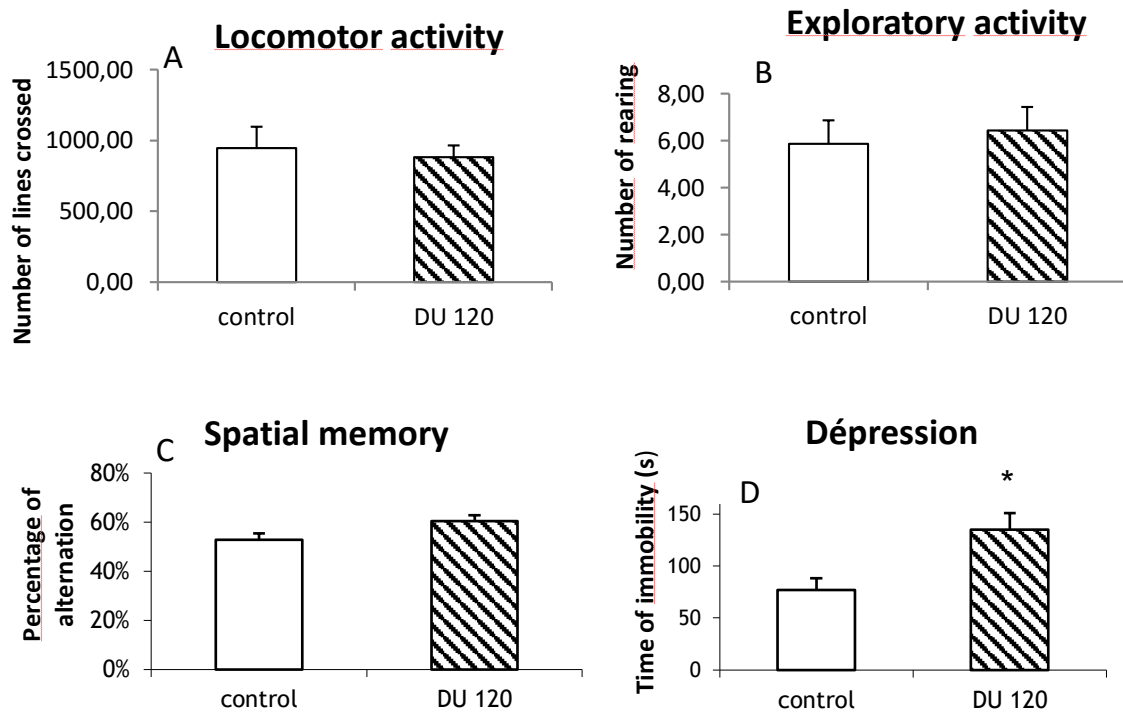


Fig 7: Behavioral tests. (A-B): Number of lines crossed reflecting locomotor activity and number of rearing movements reflecting exploratory activity. (C): Percentage of alternation of arms in the Y-maze for spatial memory assessment. (D): Time of immobility is expressed in seconds and reflects the depression level. The data are presented as mean \pm SD, $n = 16$ for each group. Asterisks indicate a significant difference between the exposed and control groups (one-way ANOVA, $*p < 0.05$). DU: depleted uranium

3.2.2.4 Étude du processus de différenciation neuronale au niveau du neuroépithélium cortical après exposition à l'uranium à 40 et à 120 mg/L

Dans cette partie, les résultats des analyses d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie seront décrits au niveau du neuroépithélium cortical des embryons et fœtus exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L. Les analyses ont été réalisées de la même façon que précédemment.

3.2.2.4.1 Expression génique *in situ* au stade E18

Les cellules exprimant Notch1 et Mash1 sont principalement localisées au niveau de la ZV du neuroépithélium cortical des fœtus exposés et non exposés à l'uranium. À ce stade, les cellules exprimant le gène NeuroD sont localisées au niveau de la plaque corticale (PC) du neuroépithélium cortical des fœtus exposés et non exposés à l'uranium. Aucune modification dans l'intensité d'expression n'a été observée entre les groupes témoins et exposés à l'uranium.

3.2.2.4.2 Étude de la nestine et de la doublecortine aux stades prénatals

Au stade E13, comme dans le neuroépithélium hippocampique, les cellules dont la nestine est marquée sont localisées sur toute l'épaisseur du neuroépithélium cortical, dans les zones ventriculaire, sous ventriculaire et dans la pré-plaque corticale des embryons témoins et exposés à l'uranium. Au stade E18, les cellules dont la nestine est marquée sont localisées dans les zones ventriculaire, sous ventriculaire et au niveau de la plaque corticale du neuroépithélium cortical des fœtus exposés ou non à l'uranium. L'analyse de la surface de la nestine marquée sur la surface totale du neuroépithélium cortical des embryons E13 n'a pas montré de différence entre les groupes témoins et exposés à l'uranium (figure 31A). En revanche, au stade E18, une augmentation de la surface de la nestine marquée a été observée au niveau du neuroépithélium cortical latéral des fœtus exposés à l'uranium à 120 mg/L (figure 31B).

Au stade E13, les cellules dont la DCX est marquée sont localisées principalement en fine couche au niveau de la pré-plaque corticale (PPC) du neuroépithélium cortical. Quelques corps cellulaires dont la DCX est marquée sont également distribués au niveau de la ZSV. L'analyse n'a pas révélé de différence dans localisation, la distribution et l'expression du marquage entre le groupe témoin et le groupe d'embryons exposés à l'uranium (figure 31A). Au stade E18, les cellules dont la DCX est marquée sont localisées dans les ZSV et dans la PC du neuroépithélium cortical des fœtus témoins et exposés à l'uranium. L'analyse quantitative a révélé une diminution de l'expression de la DCX uniquement au niveau latéral du neuroépithélium cortical des fœtus exposés à 40 mg/L d'uranium (figure 31B).

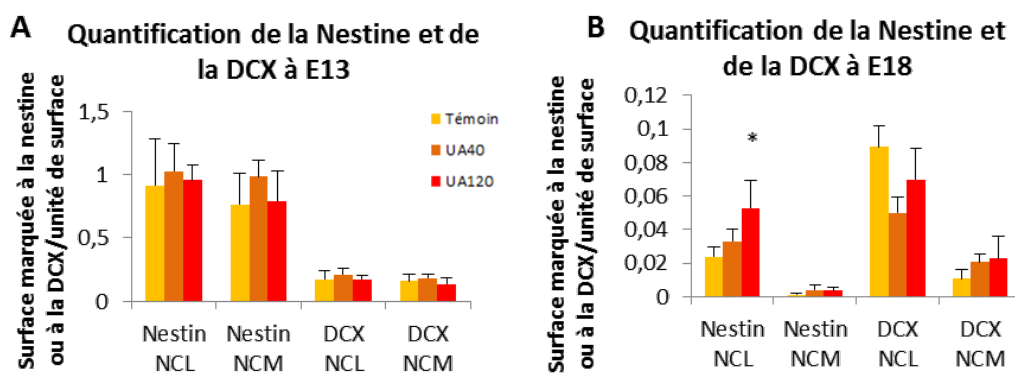


FIGURE 31 – Quantification des surfaces de la nestine ou de la DCX marquée par unité de surface du neuroépithélium cortical à E13 (A) et à E18 (B) au niveau latéral et médian

NCL : Neuroépithélium cortical latéral, NCM : Neuroépithélium cortical médian.

Au niveau du neuroépithélium cortical, nos résultats n'ont pas révélé de modifications dans l'expression des gènes Notch1, Mash1 et NeuroD chez les animaux exposés à l'uranium. De plus, aucune modification dans le marquage immunohistochimique de la DCX n'a été mis en évidence au niveau des embryons E13 et des fœtus E18. Enfin, une augmentation du marquage immunohistochimique de la nestine a été observée dans le neuroépithélium cortical des fœtus E18 exposés à l'uranium à 120 mg/L.

L'ensemble de ces résultats montre donc qu'une exposition à l'uranium dès le stade *in utero* entraîne des perturbations dans les processus de prolifération, de mort cellulaire et de différenciation neuronale aux stades prénatals et postnatals. Ces modifications sont majoritairement retrouvées à la plus forte concentration d'uranium. De plus, ces perturbations sont associées à une augmentation de l'état dépressif des rats exposés à l'uranium à 120 mg/L jusqu'à l'âge de 21 jours.

3.3 Modification de la neurogenèse et du comportement des rats adultes exposés à l'uranium dès le stade *in utero*

Dans cette partie, nous allons déterminer si une exposition à l'uranium dès le stade *in utero* et jusqu'à l'âge de 2 mois induit des perturbations de la neurogenèse et plus particulièrement des processus de prolifération et de différenciation neuronales. Nous déterminerons également si cette exposition à l'uranium induit des troubles comportementaux à l'âge adulte.

3.3.1 Effets de l'uranium sur le processus de neurogenèse

3.3.1.1 Effets sur la morphologie structurale de l'hippocampe

Les colorations au crésyl violet nous ont tout d'abord permis d'analyser l'aspect morphologique des différentes régions de l'hippocampe. Chez les animaux exposés, nous n'avons pas observé de modification dans les structures et dans l'organisation des différentes couches du gyrus denté. Dans la région CA1 des animaux exposés à l'uranium, aucune modification n'a été observée par rapport aux animaux témoins. En revanche, dans la région CA3 de certains animaux exposés à l'uranium, la distribution des corps cellulaires de la couche des cellules pyramidales est altérée. Une désorganisation cellulaire est observée chez deux animaux sur cinq exposés à l'uranium à 40 mg/L et chez cinq animaux sur sept exposés à l'uranium à 120 mg/L (figure 32A,B,C). De plus, la couche des cellules pyramidales est rompue dans la région CA3 d'un animal exposé à l'uranium à 120 mg/L (figure 33).

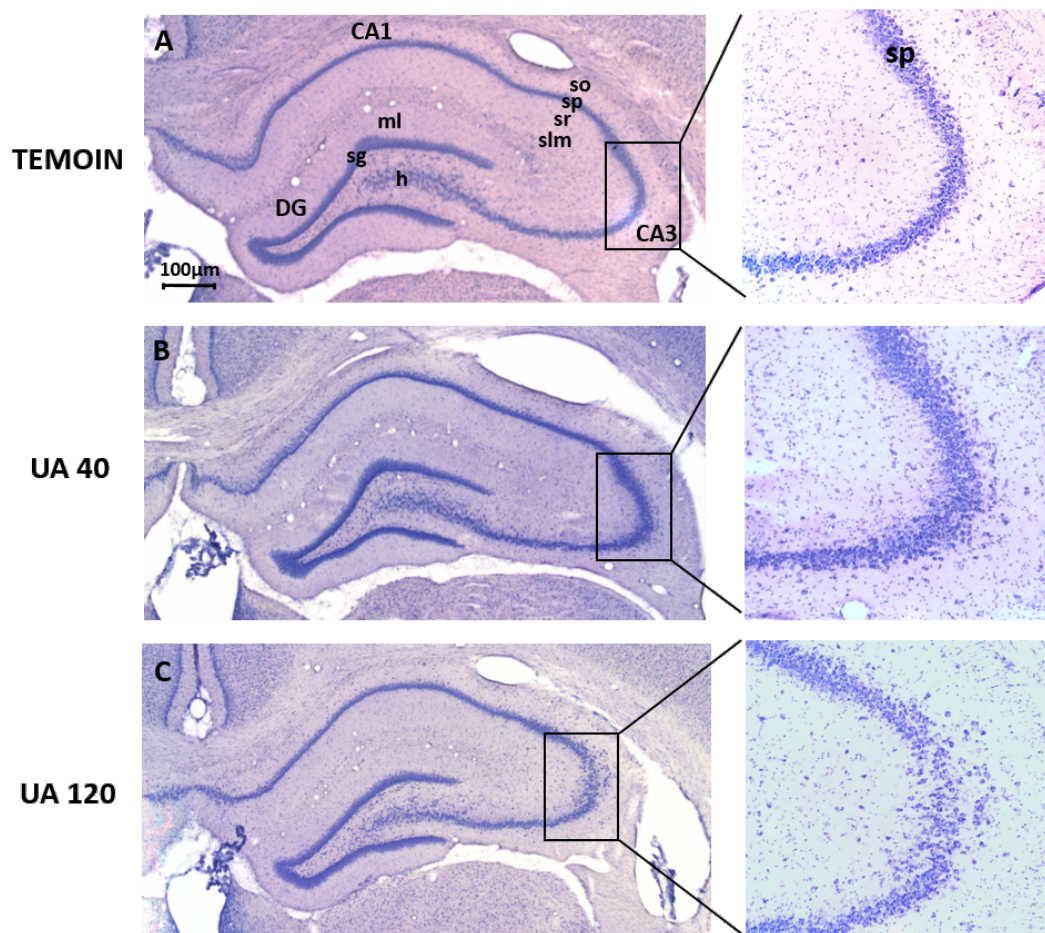


FIGURE 32 – Coloration au crésyl violet de coupes transversales d'hippocampe de rats adultes

Visualisation de la dispersion cellulaire dans la région CA3 chez les animaux exposés à l'UA 40 et à l'UA 120 par rapport au témoin. A : groupe témoin. B : groupe UA 40. C : groupe UA 120. CA1, CA2 et CA3 : Corne d'Ammon, so : stratum oriens, sp : stratum pyramidale, sr : stratum radiatum, slm : stratum lacunosum moleculare, DG : gyrus denté, h : hile, ml : couche moléculaire, sg : stratum granulosum.

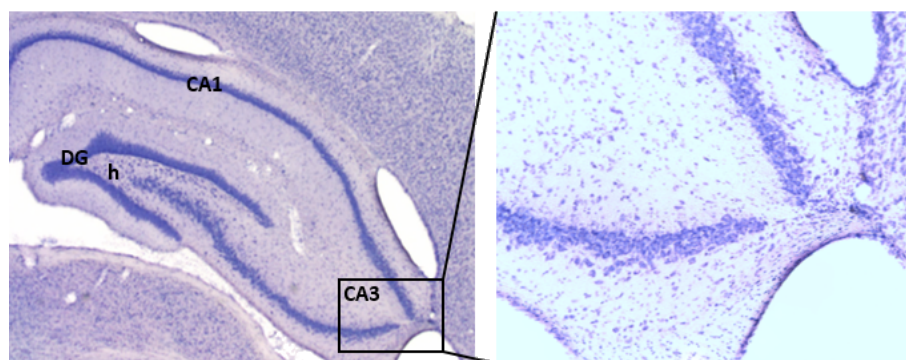


FIGURE 33 – Coloration au crésyl violet d'une coupe transversale d'hippocampe d'un animal exposé UA 120

Visualisation de la coupure dans la région CA3 de l'hippocampe. CA1, CA2 et CA3 : Corne d'Ammon GD : gyrus denté, h : hile.

3.3.1.2 Effets sur le processus de prolifération cellulaire dans la zone sous-granulaire

L'analyse de la prolifération cellulaire a été réalisée suite à l'injection de BrdU 48 et 24 heures avant le sacrifice des animaux. Au niveau du gyrus denté des animaux témoins et exposés à l'uranium, les cellules ayant incorporé le BrdU ont un noyau rond et bien défini et sont localisées principalement au niveau de la zone sous-granulaire (figure 34A,B,C). La quantification par comptage du nombre de cellules ayant incorporé le BrdU au niveau des zones sous-granulaire et couches des cellulaires granulaires n'a pas révélée de modification entre les groupes témoin et exposé l'uranium (figure 34D).

L'uranium ne semble donc pas altérer la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté des rats âgés de deux mois exposés à l'uranium durant la vie entière. Un double marquage en utilisant l'anti-corps anti-NeuN, qui est un marqueur des neurones matures, nous a ensuite permis de déterminer le pourcentage de cellules nouvellement formées qui devenaient des neurones matures. Pour cela, nous avons déterminé le rapport du nombre de cellules marquées au BrdU sur le nombre de cellules doublement marquées (BrdU et NeuN) au niveau de deux zones de la couches des cellules granulaires (la pointe du gyrus denté et d'une autre région dans la couche des cellules granulaires) (figure 35). Au niveau du gyrus denté des rats témoins, sur un total de 143 cellules BrdU positives, 136 étaient également NeuN positives soit un total de 95 % de cellules doublement marquées. Pour les rats exposés à l'uranium à 40 mg/L, sur 166 cellules BrdU positives, 159 étaient également NeuN positives, soit un rapport de 94 %. Enfin pour le groupe d'animaux exposés à 120 mg/L, sur 183 cellules BrdU positives, 175 étaient NeuN positives soit 95 % des cellules. L'analyse quantitative n'a pas montré de différence entre les groupes exposés et témoin, le pourcentage de cellules nouvellement formées devenant des neurones matures n'est donc pas altéré par l'uranium (figure 36).

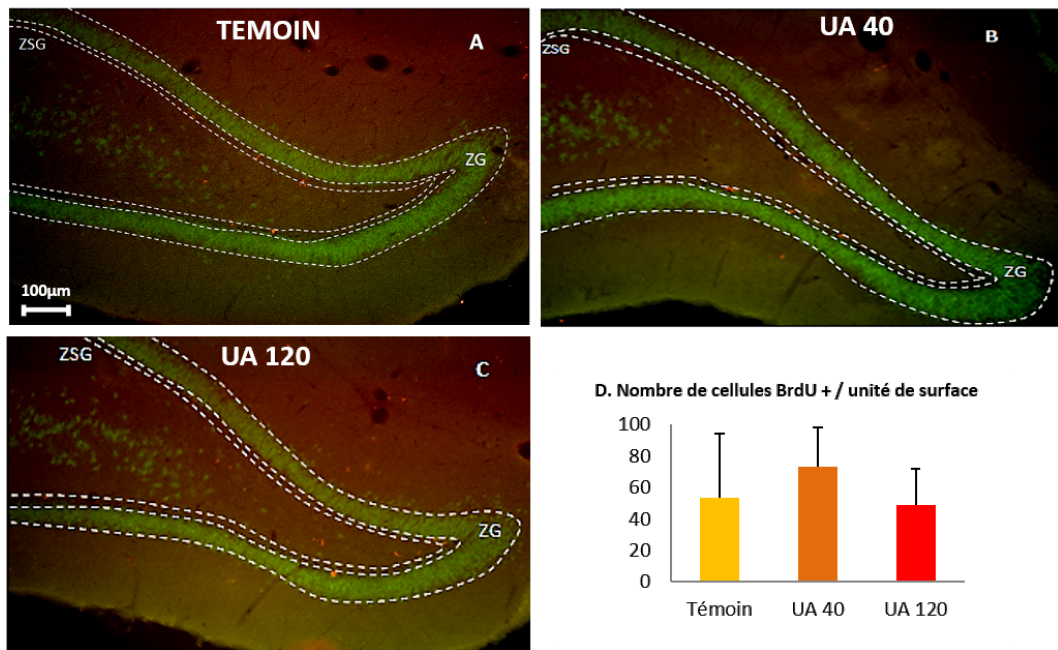


FIGURE 34 – Étude de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté des rats adultes
 Marquage au BrdU au niveau du gyrus denté de l'hippocampe. A : groupe témoin. B : groupe UA 40. C : groupe UA 120. D : quantification du nombre de cellules marquées au BrdU rapporté à la surface totale chez les groupes témoin et exposés. Test statistique ANOVA qui n'a pas révélé de différence significative. ZG : zone granulaire, ZSG : zone sous-granulaire.

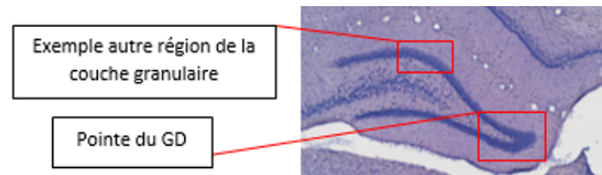


FIGURE 35 – Description des zones du gyrus denté étudiées au microscope confocal

3.3.1.3 Effets sur le processus de différenciation neuronale

La doublecortine est localisée dans les corps cellulaires au niveau de la zone sous-granulaire et de la couche des cellules granulaires, dans les prolongements dendritiques des neurones en différenciation dans la couche moléculaire et dans les prolongements axonaux vers la région CA3 du gyrus denté des rats témoins (figure 37A). Au niveau du gyrus denté des animaux exposés à l'uranium, les corps cellulaires dont la DCX est marquée sont également localisés au niveau de la zone sous-granulaire et de la couche des cellules granulaires. Les prolongements dendritiques sont localisés dans la couche moléculaire du gyrus denté. Cependant, le marquage est moins homogène et présente des discontinuités dans la distribution des corps cellulaires dont la DCX est marquée (figure 37B,C). Une diminution de la surface de la DCX marquée par rapport à la surface totale des zones sous-granulaire et couche à cellules granulaires est observée dans le gyrus denté des animaux

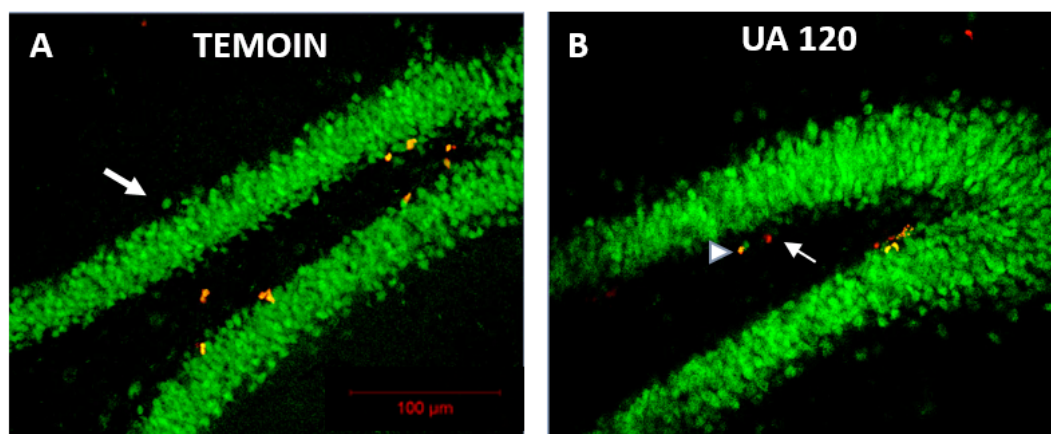


FIGURE 36 – Étude du devenir des cellules marquées au BrdU au niveau de la pointe du gyrus denté des rats adultes

Marquage BrdU/NeuN au niveau de la pointe du gyrus denté. A : groupe témoin. B : groupe UA 120. Visualisation au microscope confocal permettant de déterminer les cellules doublement marquées. Les cellules vertes sont NeuN positives (→), les cellules rouges sont celles ayant incorporé le BrdU (→) et les cellules en jaune présentent un co-marquage (▶).

exposés à l'uranium. Pour le groupe témoin, le rapport de la surface est de $0,07 \pm 0,01$, de $0,02 \pm 0,01$ pour le groupe exposé à 40 mg/L et de $0,02 \pm 0,01$ pour le groupe exposé à 120 mg/L ($p < 0,001$) (figure 37D).

3.3.2 Études comportementales des rats adultes après exposition dès le stade *in utero*

Les tests comportementaux sur les rats âgés de 2 mois ont été réalisés de la même façon qu'au stade P21. À l'âge de deux mois, les rats exposés à l'uranium dès le stade *in utero* ne présentent pas de modification de leurs activités locomotrice et exploratrice (figure 38A,B). En revanche, les rats exposés à l'uranium présentent une diminution du pourcentage d'alternance entre les branches du labyrinthe en Y et donc présentent une diminution de la mémoire spatiale après exposition à 120 mg/L d'uranium (figure 38C). De plus, une augmentation du temps de résignation des rats exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L a été observée, ce qui traduit une augmentation de la dépression des rats âgés de 2 mois exposés à l'uranium (figure 38D).

En conclusion, l'exposition à l'uranium dès le stade *in utero* et jusqu'à l'âge de deux mois entraîne des modifications dans le processus de différenciation neuronale, sans modification du processus de prolifération cellulaire. Les animaux exposés présentent également des troubles de la mémoire spatiale et de la dépression.

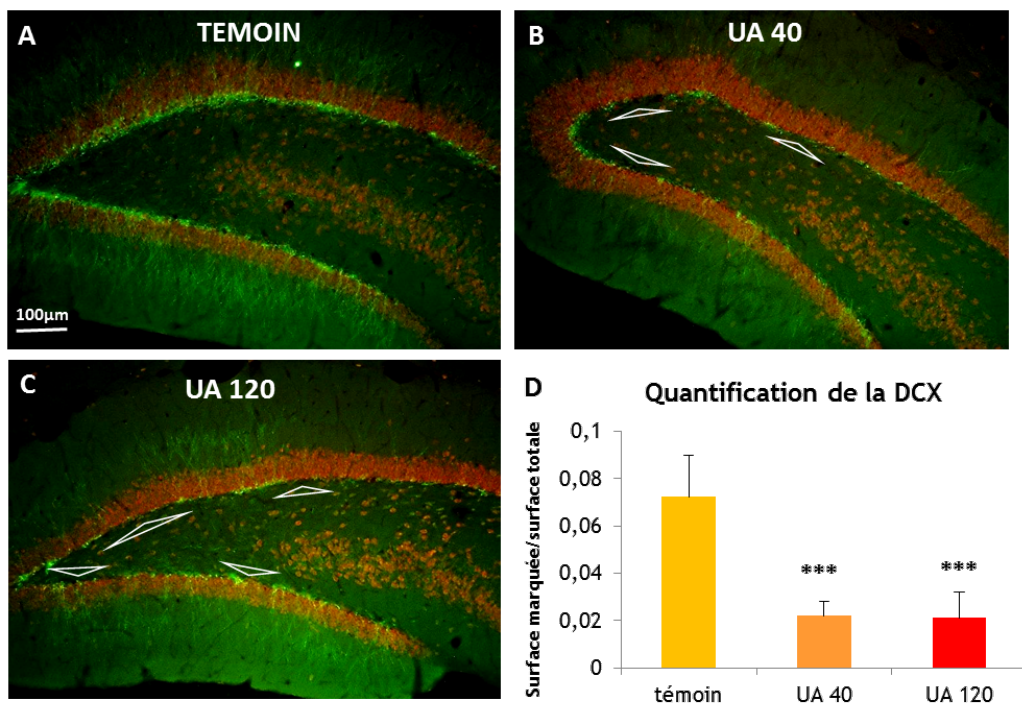


FIGURE 37 – Étude de la différenciation neuronale au niveau du gyrus denté des rats adultes

Marquage doublecortine au niveau du gyrus denté. A : groupe témoin. B : groupe UA 40. C : groupe UA 120. D : quantification de la surface marquée sur la surface totale (ZSG + ZG). Un test ANOVA à un paramètre a été utilisé (***) $p < 0,001$. Δ : exemple de discontinuités dans la distribution des corps cellulaires dont la DCX est marquée.

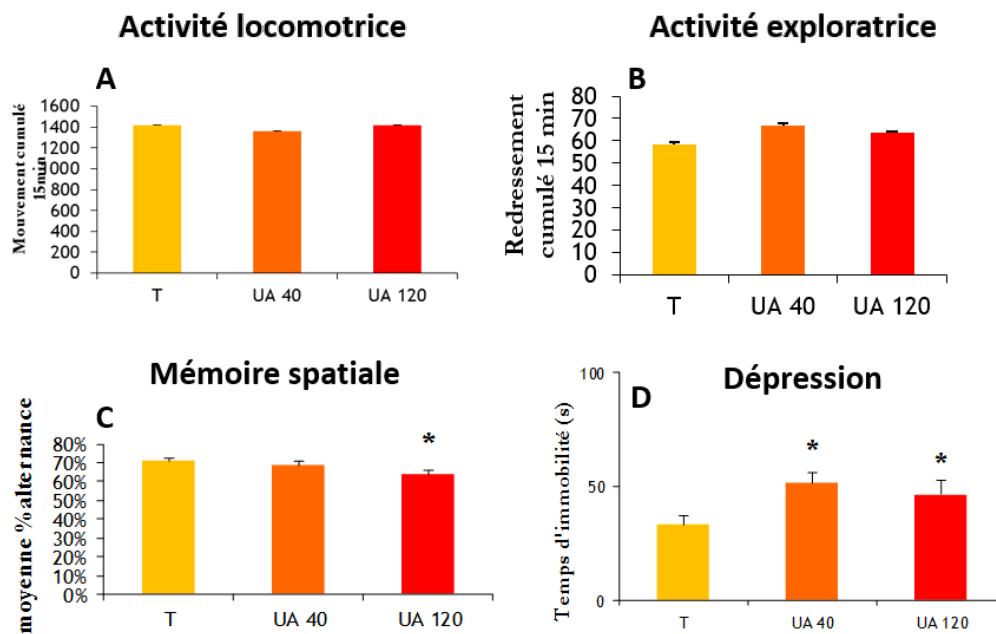


FIGURE 38 – Étude du comportement des rats adultes

A,B : Représentation graphique du nombre de mouvements et redressements effectués par les rats dans l'actimètre pour les rats témoins et exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L. C : Représentation graphique du pourcentage d'alternance entre les branches du labyrinthe en Y en fonction du groupe témoin et exposés à l'uranium. D : Représentation graphique du temps d'immobilité des rats dans la piscine pour le groupe témoin et les groupes exposés à l'uranium. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. Un test ANOVA à un paramètre a été utilisé, la différence est significative pour $p < 0,05$.

3.4 Récapitulatif des résultats

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie sont résumés dans la figure 39.

	E13	E18	PND 0	PND 5	PND 21	2 mois
Apoptose	=	=	=	↑ 40mg/L 120mg/L	=	
Mort cellulaire	↓ 120mg/L NC	↓ 120mg/L NC	↑ 120mg/L	↑ 120mg/L	=	
Prolifération cellulaire	=	↑ 120mg/L ND	=	=	↓ 120mg/L	=
HIS	↓ Wnt3a 120mg/L NH	↑ Notch1 Mash1 120mg/LNH, ND = NeuroD NeuroD2		= Notch1 Mash1 NeuroD NeuroD2		
Nestine-NeuN /DCX	=	↑ Nestine 120mg/LNC	=	↓ DCX 40mg/L	↑ DCX 40mg/L 120mg/L	↓ DCX 40mg/L 120mg/L
Comportement					↑ dépression 120mg/L	↑ dépression 40mg/L 120mg/L ↓ mémoire spatiale 120mg/L

FIGURE 39 – Résumé des résultats sur le processus de neurogenèse et sur le comportement des rats

Résumé des études sur le processus de mort cellulaire et d'apoptose, sur le processus de prolifération cellulaire, sur le processus de différenciation neuronale ainsi que sur le comportement des animaux aux stades P21 et deux mois en fonction de la concentration d'uranium.

Aux stades postnatals et adulte les études ont été réalisées au niveau du gyrus denté de l'hippocampe.

NC : neuroépithélium cortical, NH : neuroépithélium hippocampique, ND : neuroépithélium denté, HIS : hybridation *in situ*.

4 Discussion

Le développement du système nerveux est un processus complexe se déroulant depuis le stade embryonnaire jusqu'à la puberté. À l'âge adulte, le cerveau est encore capable de produire des nouveaux neurones dans des zones spécifiques, impliqués dans la plasticité synaptique. Tout au long de sa vie, l'Homme est continuellement exposé à des composés neurotoxiques. Une exposition pendant les périodes critiques de développement peut entraîner des troubles dans la formation du cerveau et être responsable de perturbations des fonctions cérébrales persistantes à l'âge adulte. Les métaux lourds, et plus particulièrement l'uranium, font partie de ces composés neurotoxiques dont la dissémination dans l'environnement est augmentée par les utilisations anthropologiques.

Au cours de ma thèse, nous avons mimé l'exposition à l'uranium de populations sensibles, à savoir les femmes enceintes et les enfants, à l'aide d'un modèle de contamination par ingestion d'eau de boisson chez les rongeurs. Deux concentrations d'uranium (40 et 120 mg/L) ont été choisies sur la base des concentrations maximales retrouvées dans l'environnement et la sensibilité de notre modèle à l'uranium. Je me suis plus particulièrement focalisée sur les processus de neurogenèse à différents stades de développement prénatal et postnatal, ainsi qu'à un stade à l'âge adulte. Le stade E13 correspond au pic de formation des cellules Cajal-Retzius qui sont les premiers neurones du cortex à être générés. Au stade E18, les couches cellulaires du néocortex apparaissent et les neurones de la région hippocampique commencent à se former. À la naissance (P0), les cinq couches du néocortex sont formées. Les cellules granulaires du gyrus denté naissent pendant la première semaine postnatale, c'est pourquoi nous avons étudié le stade P5. Au stade P21, l'ensemble des structures du néocortex et de l'hippocampe sont formées. C'est un stade de transition entre le développement et le stade adulte. Le stade 2 mois correspond à un stade adulte jeune où le processus de neurogenèse est encore actif au niveau du gyrus denté de l'hippocampe.

Dans cette partie discussion, nous tenterons de répondre à plusieurs questions à partir des résultats obtenus :

1. Où est retrouvé l'uranium dans les tissus après exposition *in utero* ?
2. L'exposition à l'uranium *in utero* a-t-elle une incidence sur l'état général des animaux ?
3. L'exposition à l'uranium dès le stade *in utero* entraîne-t-elle des modifications dans les processus de la neurogenèse ?
4. Quelles peuvent être les conséquences neurophysiologiques suite aux modifications observées dans les processus de neurogenèse ?

4.1 Où est retrouvé l'uranium dans les tissus après exposition *in utero*?

Suite à une exposition à l'uranium, il est important de connaître les quantités qui s'accumulent dans les tissus et notamment dans les reins des femelles gestantes, mais aussi les quantités qui passent à travers le placenta et qui atteignent le fœtus.

Dans nos conditions expérimentales, les mesures de quantités d'uranium dans les reins des femelles gestantes, principaux organes de stockage de l'uranium, nous ont permis de déterminer le niveau de contamination des animaux et confirment qu'ils ont bien été contaminés à l'uranium (tableau 7A). Les concentrations d'uranium retrouvées dans les reins des femelles exposées à la plus forte concentration d'uranium (120 mg/L) sont d'environ 1,5 fois inférieures aux quantités induisant une néphrotoxicité, dont le seuil est de 3 µg/gramme de rein (Diamond *et al.* 1989, Poisson *et al.* 2014). Notre étude se situe donc dans des conditions non néphrotoxiques.

4.1.1 Présence d'uranium dans les embryons/fœtus et dans les reins

Au cours de la gestation, les quantités d'uranium retrouvées dans les corps entiers des embryons E13 et des fœtus E18 exposés ne sont pas statistiquement supérieures aux groupes témoins. En revanche, dans les corps des rats P0 exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L, les quantités retrouvées sont plus importantes comparées au groupe témoin (tableau 7B). En se basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que l'uranium ne s'accumulerait que dans les derniers jours de gestation.

Il est établi que l'uranium passe à travers le placenta, mais le taux de transfert ainsi que les mécanismes de son passage sont très peu étudiés (Sikov *et al.* 1968). L'équipe de Sanchez a observé la présence d'uranium dans le placenta et dans les fœtus dès le stade E14 après exposition à de fortes concentrations d'uranium (40 et 80 mg/kg/jour). Cependant, malgré les fortes concentrations d'uranium ingérées par les femelles gestantes, très peu d'uranium est retrouvé dans le placenta comparé aux quantités retrouvées dans les reins (19,72±10,24 ng/g après exposition à 40 mg/kg/jour et 34,59±17,67 ng/g après exposition à 80 mg/kg/jour, soit respectivement 38 et 100 fois inférieures aux quantités d'uranium dans les reins). De plus, le taux de transfert entre le placenta et le fœtus est faible, car la quantité d'uranium retrouvée est respectivement de 3,57±1,75 ng/g et 5,48±3,36 ng/g après exposition à 40 et 80 mg/kg/jour (Sanchez *et al.* 2006). Les propriétés de perméabilité du placenta évoluent durant toute la durée de la gestation laissant passer des substances en plus ou moins forte quantité en fonction de leurs propriétés et du temps de gestation, comme dans le cas des métaux lourds (Gundacker et Hengstschläger 2012). Par exemple, le cadmium traverse plus facilement le placenta aux derniers stades de gestation. Ce passage est associé à une diminution de la métallothionéine, une protéine impliquée dans la détoxification des métaux lourds (Chisolm *et al.* 1987, Benitez *et al.* 2009). Par conséquent, une des hypothèses pour expliquer la quantité d'uranium retrou-

vée au stade P0 serait que le placenta est peu perméable à l'uranium pendant les premiers stades de gestation et au contraire davantage perméable dans les derniers jours de gestation. Les mécanismes de passage à travers le placenta restent donc à explorer. En se basant sur les études réalisées sur le cadmium, il serait intéressant, dans un premier temps, de mesurer l'uranium dans le placenta ainsi que le taux de métalloprotéine dans le placenta à différents stades de gestation suite à l'exposition à l'uranium. Enfin, des transporteurs comme le DMT1 (divalent metal transporter 1) abondamment exprimés dans le placenta pendant toute la gestation sont connus pour leur rôle dans le transport du plomb ou du cadmium à travers le placenta et pourrait également intervenir dans le transport de l'uranium jusqu'au fœtus (Bressler *et al.* 2004). Une augmentation du taux de DMT1 a déjà été mise en évidence dans le cortex entorhinal de rats suite à une exposition à l'uranium appauvri pendant 9 mois (Lestaevel *et al.* 2009). Pour confirmer le possible transport de l'uranium par l'intermédiaire de ce transporteur, il est nécessaire de mesurer en parallèle les quantités d'uranium retrouvées dans le placenta ainsi que le taux de DMT1 suite à une exposition à l'uranium.

Une augmentation de la quantité d'uranium est observée dans la partie du corps des ratons P5 contenant les reins et de façon plus importante dans les reins des ratons P21 exposés. À ces stades, les animaux sont en plus exposés à l'uranium *via* le lait maternel comme précédemment démontré (Wappelhorst *et al.* 2002).

Au stade P21, la plus forte quantité d'uranium retrouvée était attendue puisque les mesures ont été réalisées directement dans les reins qui sont les principaux organes de stockage de l'uranium. De plus, en parallèle du lait maternel, les animaux approchant l'âge du sevrage commencent à boire directement l'eau du biberon et ingèrent une quantité d'uranium plus importante. Il serait intéressant de mesurer l'uranium dans le lait afin de corréliser la quantité d'uranium retrouvée dans les reins et celle dans le lait. Au stade adulte 2 mois, les quantités d'uranium retrouvées dans les reins sont plus importantes, les animaux étant directement contaminés par ingestion d'eau de boisson.

4.1.2 Présence d'uranium dans le cerveau

Dans nos conditions expérimentales, nos analyses n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les groupes témoins et exposés dans les quantités d'uranium mesurées dans les têtes des embryons/fœtus, ce qui est cohérent avec les mesures d'uranium dans les animaux corps entier. Nos analyses n'ont pas non plus mis en évidence de différence dans les quantités d'uranium dans les cerveaux des ratons jusqu'à P21 entre les groupes témoins et exposés à l'uranium. À la dose de 80 mg/kg/jour, l'équipe de Sanchez n'a pas non plus mesuré d'uranium dans le cerveau des ratons P30 exposés à l'uranium dès le stade *in utero* malgré une forte quantité retrouvée dans les reins (Sanchez *et al.* 2006). De même, après une exposition à l'uranium à 40 mg/L à partir de la naissance et pendant 3 semaines, les mesures de quantité d'uranium dans le cortex entorhinal sont similaires

entre les groupes témoin et exposés (Lestaevel *et al.* 2013). Ces données mettent en avant qu'au cours du développement des mécanismes sont mis en place pour empêcher l'uranium d'atteindre le cerveau. La principale barrière à l'interface entre le sang et le cerveau est le complexe neurovasculaire composé notamment de la barrière hématoencéphalique. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction (1.2.1.3), au cours du développement, ce complexe joue un rôle majeur dans la protection du cerveau contre les substances toxiques. À partir du stade E9 chez les rongeurs, les premiers vaisseaux formés ont déjà les propriétés fonctionnelles de la barrière avec notamment la présence de jonctions serrées et de transporteurs évitant ainsi le passage de certaines molécules dans le cerveau (Vigintino *et al.* 1998, Liebner *et al.* 2011), ce qui pourrait être le cas de l'uranium.

Dans le cerveau des animaux exposés dès le stade *in utero* jusqu'à l'âge de 2 mois, une augmentation significative de la quantité d'uranium a été observée par rapport aux animaux témoins. Suite à des contaminations chez des rats adultes ou à partir de la naissance, il a précédemment été détecté la présence d'uranium dans le cerveau entier mais en très faible quantité, de l'ordre du ng/g de tissu (Lestaevel *et al.* 2005, Houpert *et al.* 2007, Lestaevel *et al.* 2013, Lestaevel *et al.* 2015). Il a également été démontré qu'il n'y avait pas de relation entre les quantités d'uranium retrouvées dans les reins et celles retrouvées dans le cerveau suite à une contamination à l'âge adulte. En effet, les quantités d'uranium augmentent dans les reins proportionnellement aux concentrations d'uranium alors que dans le cerveau la quantité d'uranium atteint un plateau entre 1 et 1,5 ng d'uranium par gramme de tissu (Dublineau *et al.* 2014). Plusieurs hypothèses peuvent donc être émises pour expliquer cette présence d'uranium, elle peut être due à la perte de l'intégrité du complexe neurovasculaire, à la mise en place d'un transport actif à l'aide des transporteurs spécifiques, comme la transferrine ou la féтуine A, sans modification de l'intégrité du complexe neurovasculaire, ou encore *via* les organes circumventriculaires.

Les mécanismes de passage de l'uranium dans le cerveau sont encore très peu étudiés aussi bien chez l'adulte que pendant le développement. Des études plus approfondies quant à ces mécanismes de passage, notamment par des études *in vitro* (Naik and Cucullo 2012), nécessitent d'être entreprises afin de comprendre comment le complexe neurovasculaire en formation empêche l'uranium d'atteindre le cerveau et comment l'uranium entre dans le cerveau chez l'adulte. De plus, des mesures des quantités d'uranium dans les structures cérébrales telles que l'hippocampe ou le cortex sont utiles afin de compléter nos résultats quant à localisation de l'uranium au sein du cerveau.

4.2 L'exposition à l'uranium *in utero* a-t-elle une incidence sur l'état général des animaux ?

L'ingestion d'uranium aux concentrations de 40 et de 120 mg/L n'entraîne pas de modification des consommations hydrique et alimentaire des femelles gestantes et des rats exposés jusqu'à l'âge de deux mois. Ceci est en accord avec les précédentes études effectuées au sein du laboratoire après exposition à l'âge adulte et après la naissance (Houpert *et al.* 2005, Lestaevel *et al.* 2005, Souidi *et al.* 2005, Gueguen *et al.* 2006, Paquet *et al.* 2006, Gueguen *et al.* 2007, Grignard *et al.* 2008, Lestaevel *et al.* 2009, Lestaevel *et al.* 2013, Lestaevel *et al.* 2015).

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition à l'uranium au cours de la gestation n'engendre pas de modification du poids des femelles gestantes ni du nombre de ratons dans la portée. Des études de reprotoxicité ont cependant mis en évidence une toxicité maternelle induite par l'ingestion d'uranium dès 5 mg/kg/jour pendant la période gestationnelle E6-E15 avec notamment des diminutions dans le poids des femelles gestantes, ainsi que dans la prise alimentaire. Cette étude a également mis en évidence une augmentation du nombre de fœtus morts à la naissance après exposition à 10 et 25 mg/kg/jour (Domingo *et al.* 1989). À très forte concentration d'uranium (80 mg/kg/jour), il a été décrit une augmentation du gain de poids des femelles exposées (Sanchez *et al.* 2006). Enfin, après exposition par injection d'uranium à 1 et 2 mg/kg/jour dans la même période gestationnelle, une toxicité maternelle a été mise en évidence par diminution du poids et une augmentation de décès des femelles gestantes (Bosque *et al.* 1993). Nous n'avons pas mis en évidence de toxicité embryonnaire ou fœtale. En effet, le poids des embryons et des fœtus n'est pas modifié et aucune malformation n'a été observée suite à l'exposition à l'uranium dès le stade *in utero*. En revanche, l'équipe de Domingo a mis en évidence des diminutions dans le poids des fœtus exposés à l'uranium dès la concentration de 5 mg/kg/jour pendant les périodes E6-E15. De plus, dans cette étude, l'uranium engendre des malformations osseuse et externe telles que des exencéphalies ou la présence de fente palatine que nous n'avons pas retrouvée dans nos conditions expérimentales (Domingo *et al.* 1989). Les différences quant à la toxicité maternelle et fœtale entre ces études et la nôtre s'expliquent par les différences dans les modes de contamination et les concentrations d'uranium différentes, les effets étant principalement observés après ingestion à de fortes concentrations d'uranium ou après injection.

En revanche, nos résultats ont mis en évidence des variations dans le poids des ratons avec une diminution du poids des nouveau-nés P0 et une augmentation du poids des ratons P5 et P21 exposés à l'uranium aux deux concentrations. Cette variation de poids n'est plus retrouvée chez les animaux âgés de 2 mois. Des perturbations dans le poids avaient déjà été montrées dans l'étude de Domingo, où l'exposition *in utero* à l'uranium entraînait des diminutions du poids des souris à P0,

P4 et P21. De plus, l'équipe de Sanchez a également observé des diminutions du poids des rats P12 et P21 exposés à l'uranium à forte concentration (80 mg/kg/jour) pendant la gestation (Sanchez *et al.* 2006). Au contraire, suite à une exposition à l'uranium démarrant à la naissance, aucune modification dans le poids des rats âgés de 10 semaines n'a été observé (Lestaevel *et al.* 2013). Après exposition à l'uranium débutant à l'âge adulte, il a également été décrit des modifications dans le poids des animaux avec une diminution de la prise de poids des animaux exposés à 2 mg/kg/jour pendant 6 ou 9 mois (Bussy *et al.* 2006). Il n'a pas été mis en évidence de modification du poids des rats exposés à l'uranium à 4 mg/kg/jour, mais il a été montré une diminution du poids des rats exposés à 7,5 mg/kg/jour (Briner et Murray 2005).

Notre étude a donc mis en évidence des modifications dans le poids des rats exposés à l'uranium mais pas des femelles gestantes. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'absorption d'uranium est plus importante chez les nouveaux nés que chez les adultes (Leggett *et al.* 1994). De plus, pour d'autres métaux lourds comme le plomb, l'exposition pendant les périodes pré et postnatales engendrent des modifications plus importantes sur la croissance et le poids des rats qu'à l'âge adulte (Selevan *et al.* 2003). Les nouveaux nés sont donc plus sensibles que les adultes, ce qui pourrait expliquer les modifications observées dans le poids des rats.

En conclusion, dans nos conditions expérimentales, l'uranium n'entraîne pas de toxicité maternelle, embryonnaire et fœtale. Les variations de poids observées chez les rats exposés à l'uranium ne sont pas retrouvées chez les animaux à l'âge adulte, suggérant que ces effets sur le poids sont transitoires.

4.3 L'exposition à l'uranium dès le stade *in utero* entraîne-t-elle des modifications dans les processus de la neurogenèse ?

Le développement du cerveau est un processus complexe pendant lequel les étapes de prolifération et de mort cellulaires, et de différenciation neuronale jouent un rôle majeur. Ces différentes étapes ont été étudiées suite à l'exposition à l'uranium à différents stades de développement, correspondant aux phases critiques de formation du néocortex et de l'hippocampe. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction (partie 1.2), le pic de formation des cellules Cajal-Retzius et des neurones de la sous-plaque corticale se situe aux alentours des stades E13 et E14 et les couches cellulaires du néocortex commencent à apparaître entre les stades E17 et E18. De plus, les neurones de la région hippocampique commencent à apparaître entre les stades E15 et E20. À la naissance, les cinq couches du néocortex sont formées et les cellules granulaires du gyrus denté naissent pendant la première semaine postnatale. Au stade P21, l'ensemble des structures sont formées (Bayer 1980).

Par conséquent, notre étude s'est concentrée sur trois structures du télencéphale (les neuroépithélia cortical, hippocampique et denté) pour la période prénatale et sur le gyrus denté de l'hippocampe pour la période postnatale.

4.3.1 Neurogenèse au cours de la période prénatale

La régulation du nombre de neurones formés pendant le développement se fait par une balance entre les processus de mort cellulaire et de prolifération cellulaire. Les résultats obtenus par les marqueurs utilisés pour étudier le processus de mort cellulaire montrent une diminution du nombre de cellules marquées au fluorojade de la pré-plaque corticale des embryons E13 exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L et des fœtus E18 exposés à l'uranium à 120 mg/L. À ces stades, les cellules apoptotiques contenant la caspase-3 activée sont principalement observées au niveau de la zone proliférative, la zone ventriculaire et leur nombre n'est pas modifié suite à une exposition à l'uranium. En se basant sur ces résultats, nous pouvons en déduire que l'uranium n'agirait pas sur le processus de mort cellulaire des cellules en prolifération mais plutôt sur les cellules post-mitotiques. Le processus de mort cellulaire est une étape clé pendant le développement du cerveau et permet de limiter le pool de cellules prolifératives, de corriger les erreurs et d'éliminer les cellules des structures transitoires. Il participe également à l'élimination des neurones ayant formé des connexions synaptiques inappropriées et est impliqué dans la régulation de la taille et de la forme du cerveau (Oppenheim 1991). Par conséquent, cette diminution du processus de mort cellulaire pourrait avoir des conséquences sur la fonctionnalité des neurones formés et sur la mise en place des réseaux neuronaux. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'uranium aurait un effet inhibiteur en diminuant l'élimination des neurones possédant des connexions synaptiques aberrantes. Cette hypothèse pourrait être confirmée par un marquage fluorojade suite à l'injection de fluorogold, un traqueur rétrograde représentant une méthode sensible pour observer les connexions synaptique entre les neurones (Zappone *et al.* 2001). Enfin, l'uranium ne semble pas agir sur le processus d'apoptose. Cependant, cette hypothèse repose uniquement sur un marqueur et a besoin d'être confirmée par d'autres techniques comme la technique TUNEL ou par immunomarquage de la caspase 9 activée.

Le processus de prolifération cellulaire a été étudié par un immunomarquage du BrdU (Bromo-désoxyUridine), injecté 4 heures avant le sacrifice. Dans les neuroépithélia cortical et hippocampique des embryons E13 et des fœtus E18, les résultats ne montrent pas de différence entre les groupes témoin et exposés. En revanche, une augmentation de la densité des cellules en division ayant incorporé le BrdU est observée dans le neuroépithélium denté des fœtus E18 exposés à l'uranium à 120 mg/L comparé aux fœtus témoins. Ces cellules sont localisées dans les zones ventriculaire et sous ventriculaire. À ce stade, la durée de la phase S du cycle cellulaire, pendant laquelle s'incorpore le BrdU est d'environ 3-4 heures (Takahashi *et al.* 1995, Calegari *et al.* 2005). Par consé-

quent, les cellules marquées ont subi une seule division cellulaire et correspondent aux progéniteurs neuronaux. En se basant sur nos résultats, l'uranium agirait comme stimulateur de la prolifération cellulaire des progéniteurs neuronaux dans le neuroépithélium denté des fœtus. Cette augmentation de la prolifération cellulaire pourrait être due à un raccourcissement de la durée du cycle cellulaire au niveau du neuroépithélium denté des fœtus exposés à l'uranium qui pourra être étudié par la suite. Le BrdU est un marqueur de la phase S du cycle cellulaire, mais il ne permet pas d'explorer les autres phases du cycle cellulaire telles que la phase M ou les phases G1 et G2. L'étude d'autres marqueurs de prolifération cellulaire tels que Ki67 ou PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) est nécessaire afin d'étudier l'ensemble du cycle cellulaire. Cependant, ces différents marqueurs ne permettent pas de déterminer précisément quels types de cellules sont en prolifération. En effet, au niveau du neuroépithélium, les cellules souches peuvent donner naissance aux neurones mais aussi aux cellules gliales. Un autre marqueur de prolifération cellulaire est le BM88 qui est un marqueur précoce des précurseurs en prolifération qui vont se diriger vers la voie de différenciation neuronale. Il est exprimé dans les précurseurs qui vont donner naissance à des neurones post-mitotiques (Koutmani *et al.* 2004). L'étude de ce marqueur nous permettrait de déterminer si l'augmentation de la prolifération cellulaire au niveau du neuroépithélium denté des fœtus E18 exposés à l'uranium est due à une augmentation des précurseurs s'engageant vers la voie de différenciation neuronale. De plus, l'injection de BrdU quatre heures avant le sacrifice des animaux ne permet de mettre en évidence qu'un seul type de population de cellules en division. Suite à une injection 1 ou 3 jours avant le sacrifice des animaux, les cellules ayant incorporé le BrdU ont quitté les zones prolifératives pour migrer vers leur emplacement définitif. Ce type d'injection met donc en évidence les cellules post-mitotiques (Miller *et al.* 1988). Afin d'étudier si l'uranium affecte la survie des cellules matures, des études utilisant différents protocoles d'injection de BrdU avant le sacrifice des animaux doivent être entreprises dans de futures expérimentations. Enfin, nous avons étudié la prolifération cellulaire suite à l'injection d'un seul analogue nucléosidique ce qui nous a permis d'évaluer la division cellulaire sans distinction du type de cellules impliquées. L'injection double de deux analogues nucléosidiques (BrdU et EdU : 5-éthynyl-2'-deoxyuridine) à deux temps différents nous permettrait de distinguer les cellules progressant dans le cycle cellulaire. En effet, suite à une injection de EdU et de BrdU à une heure d'intervalle, trente minutes avant le sacrifice des animaux, les cellules en début de phase S seront EdU-BrdU+, les cellules en fin de phase S seront EdU+BrdU+ et les cellules déjà passées à la phase suivante seront EdU+BrdU- (Giltin *et al.* 2014).

Le développement du cortex et de l'hippocampe est régulé par de nombreuses voies de signalisation établissant une balance entre le maintien des cellules dans le cycle cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire menant à la différenciation des cellules. En effet, aux stades précoces de développement, les cellules entretiennent un état prolifératif et d'autorenouvellement important favorisant la mul-

tiplication des cellules. Aux stades plus tardifs, cette capacité d'auto-renouvellement diminue pour permettre aux cellules de rentrer dans le processus de différenciation neuronale. Au stade E13, nos résultats ont mis en évidence une diminution quantitative de l'expression génique de Wnt3a dans le cerveau des embryons exposés à 40 et à 120 mg/L. De plus, l'expression *in situ* du facteur Wnt3a au niveau du neuroépithélium hippocampique des embryons exposés à 120 mg/L est diminuée. À ce stade, la voie de signalisation Wnt joue un rôle central dans le développement de l'hippocampe et du gyrus denté (Lee *et al.* 2000, Galceran *et al.* 2000) et est impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules souches (Hirabayashi et Gotoh 2005). En effet, les souris KO pour Wnt3a présentent une absence morphologique d'hippocampe due à une réduction de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Lee *et al.* 2000). La voie Wnt induit la stabilisation de la β -caténine qui par association avec des facteurs de transcription, tels que le facteur de transcription LEF1 (Hink *et al.* 1994), participent à la régulation de la prolifération cellulaire en induisant la transcription de c-myc et de la cycline D1. Il pourrait donc être intéressant, pour compléter nos résultats, de mesurer l'expression de la β -caténine et du facteur c-myc et de la cycline D1 par western blot pour évaluer l'impact de cette diminution de Wnt3a sur le processus de prolifération cellulaire. La diminution d'expression de Wnt3a observée dans le neuroépithélium hippocampique des embryons n'est pas suffisante pour engendrer une diminution de la prolifération des progéniteurs neuronaux à ce stade. Cependant, cette diminution dans l'expression de Wnt3a pourrait se répercuter sur le processus de prolifération aux stades plus tardifs, comme aux stades E18 où nos résultats ont mis en évidence des perturbations dans la prolifération cellulaire dans le neuroépithélium dentée. Nous n'observons pas non plus de modification morphologique de l'hippocampe aux stades de développement plus tardifs. La voie de signalisation Wnt fait intervenir de nombreux autres facteurs, tels que le facteur Wnt1, qui régule la prolifération des cellules souches et des progéniteurs nerveux situés au bord des ventricules latéraux (Dickinson *et al.* 1994). Par conséquent, les effets d'une diminution de l'expression de Wnt3a peuvent être contrecarrés par l'activation d'autres voies de signalisation, ce qui est concordant avec le fait que la morphologie de l'hippocampe n'est pas modifiée dans notre étude. Cette hypothèse pourra être confirmée par l'étude de l'expression des autres facteurs de la famille Wnt et notamment Wnt1 au niveau du neuroépithélium hippocampique des embryons exposés à l'uranium. Les cellules souches ou les progéniteurs neuronaux qui prolifèrent peuvent donner naissance à des neurones ou à des cellules gliales. La détermination vers la voie neuronale est régulée notamment par les voies de signalisation Notch incluant les facteurs Notch1 et Mash1. L'expression quantitative par RT-PCR n'a pas mis en évidence de modification d'expression de ces gènes au niveau du cerveau des fœtus E18 exposés à l'uranium. Cependant, l'analyse d'expression par hybridation *in situ* de Notch1 par les cellules au niveau de la zone ventriculaire des neuroépithélium hippocampique et denté des fœtus exposés à l'uranium à 120 mg/L est diminuée alors que l'expression de Mash1 est augmentée. La différence entre ces deux résultats pourrait s'expliquer par le fait

qu'une modification localisée au niveau du gyrus denté de l'hippocampe serait masquée lors de l'analyse de l'expression génique quantitative par RT-PCR puisque cette dernière a été réalisée au niveau du cerveau entier. À ce stade, les cellules exprimant Notch1 sont localisées dans la zone ventriculaire du neuroépithélium denté, alors que les cellules exprimant Mash1 sont localisées dans la route de migration du neuroépithélium denté vers la matrice tertiaire (Pleasure *et al.* 2000). Ces gènes sont impliqués dans l'induction de la différenciation vers la voie neuronale et dans le processus de prolifération cellulaire. En effet, une expression élevée de Notch1 induit la différenciation neuronale par arrêt du cycle cellulaire alors qu'un faible taux d'expression favorise la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules (Guentchev *et al.* 2006). À l'inverse, l'expression de Mash1 favorise la division cellulaire au stade prénatal (Castro *et al.* 2011). En s'appuyant sur ces données de la littérature et sur nos résultats, l'uranium induirait une diminution de l'entrée vers la voie de différenciation neuronale, ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire, ce que nous observons au niveau du neuroépithélium denté des fœtus exposés à l'uranium. En revanche, des analyses d'autres acteurs de la voie de signalisation Notch sont nécessaires pour compléter notre étude, par exemple des facteurs anti-neurogéniques tels que les enhancer-of-split (Hes1 and Hes5) et les gènes Id1, Id2, Id3, and Id4 qui sont régulés par la voie Notch et qui bloquent l'entrée vers la voie de différenciation (Benezra *et al.* 1990, Kageyama *et al.* 1997). De plus, l'étude de l'expression des neurogénines 1 et 2, connues pour jouer un rôle dans la détermination neuronale (Sommer *et al.* 1996) nous permettrait de renforcer nos résultats.

Une fois entrée dans le processus de différenciation neuronale, les neurones immatures expriment notamment le gène NeuroD et les neurones matures expriment le gène NeuroD2. Après exposition à l'uranium, nous n'avons pas mis en évidence de modification de ces deux gènes au niveau des neuroépithélia cortical, hippocampique et denté. L'expression génique quantitative de ces gènes par RT-PCR n'a pas non plus mis en évidence de modification au niveau du cerveau des fœtus exposés à l'uranium. De plus, l'expression de la doublecortine dans les neurones immatures n'est pas modifiée dans ces mêmes régions, suggérant que le pool de neurones immatures n'est pas altéré par l'uranium à ce stade. Sur la base de ces résultats, l'uranium n'aurait pas d'impact sur les neurones déjà engagés dans la voie de différenciation neuronale. Afin de le confirmer, d'autres marqueurs de neurones immatures tels que le microtubule-associated protein 2 (MAP-2) ou la β III Tubulin (TuJ1) après exposition à l'uranium sont à analyser.

4.3.2 Neurogenèse au cours de la période postnatale

Après la naissance, nous nous sommes intéressés au développement de l'hippocampe et plus spécifiquement du gyrus denté, qui est une des principales zones neurogénique à l'âge adulte. Une augmentation du nombre de cellules marquées au fluorojade a été observée au niveau du gyrus

denté des rats nouveaux nés et des ratons P5 exposés à l'uranium à la plus forte concentration. Cette augmentation est associée à une augmentation du nombre de cellules caspase-3 positives aux deux stades mais est significativement augmentée seulement dans le gyrus denté des ratons P5 exposés à l'uranium. Aucune modification dans le processus de mort cellulaire ni d'apoptose n'a été mise en évidence dans le gyrus denté des rats P21. En se basant sur ces résultats, le processus de mort cellulaire semble amplifié par l'exposition à l'uranium uniquement aux temps postnatals précoces, au cours desquels le tissu cérébral serait plus sensible aux toxiques qu'au stade plus tardif. L'uranium est connu pour engendrer des dommages à l'ADN, tels que des cassures double-brins ou la formation de micronoyaux (Monleau *et al.* 2006a, Monleau *et al.* 2006b, Hao *et al.* 2009). En effet, l'exposition à l'uranium de cellules embryonnaires issues du zebrafish entraîne l'augmentation du nombre de cassures double-brins. De plus, la présence d'uranium dans ces cellules perturbe la voie de signalisation NHEJ (non-homologous end-joining) indispensable aux mécanismes de réparation de ces cassures (Pereira *et al.* 2012). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'apoptose observée aux stades P0 et P5 serait due à une augmentation du nombre de cassures double-brins non réparées. Cette hypothèse pourra être confirmée par l'étude du marquage γ H2AX au niveau du gyrus denté des ratons exposés à l'uranium.

Contrairement aux résultats obtenus sur le processus de mort cellulaire, le processus de prolifération cellulaire est perturbé uniquement au stade plus tardif du développement postnatal avec une diminution du nombre de cellules ayant incorporé le BrdU dans la couche des cellules granulaires et dans la zone sous granulaire du gyrus denté des rats P21 exposés à la concentration de 120 mg/L. Aucune modification n'a été observée aux stades P0 et P5.

L'exposition à l'uranium n'entraîne pas de modification de l'expression génique par RT-PCR de Mash1, Notch1, NeuroD et NeuroD2 dans l'hippocampe des nouveau-nés. Au stade P5, l'expression génique par RT-PCR et par hybridation *in situ* n'a pas non plus mis en évidence de modification dans l'expression de ces gènes après exposition à l'uranium. De plus, le marquage de la doublecortine n'est pas modifié dans le gyrus denté des nouveau-nés et des ratons P5 exposés à l'uranium à 120 mg/L. En se basant sur ces résultats, l'exposition à l'uranium pendant la gestation et au cours des premiers jours postnatals n'entraîne pas de modification dans les processus d'engagement vers la voie de différenciation neuronale médiée par les gènes Notch1 et Mash1 et dans le processus de différenciation neuronale médiée par les gènes NeuroD et NeuroD2 dans l'hippocampe. Ces résultats nécessitent d'être confirmés et complétés par l'étude d'autres marqueurs de la différenciation neuronale, tels que les marqueurs MAP-2 et Tuj1 ou encore le polysialic acid-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM), marqueurs des neurones immatures. De plus, d'autres acteurs de différenciation neuronale tardive, tels que les gènes Math2 et Math3, seraient également à étudier afin de consolider nos résultats (McCormick *et al.* 1996). Au stade P21, nos analyses montrent une aug-

mentation du nombre de neurones dont la doublecortine est marquée au niveau du gyrus denté des rats exposés à l'uranium à 40 et à 120 mg/L. La doublecortine joue un rôle dans la prolifération cellulaire (Pramparo *et al.* 2010, Santra *et al.* 2011), en maintenant un équilibre entre la division des cellules souches neurales et des progéniteurs neuronaux. Dans notre étude, l'augmentation du nombre de cellules contenant la doublecortine pourrait ainsi illustrer des modifications dans le processus de prolifération cellulaire, ce que nous observons d'ailleurs par une diminution de la division cellulaire au stade P21 ; mais également une augmentation du pool de neurones immatures. Pour appuyer cette hypothèse, il a précédemment été montré une augmentation du nombre de neurones immatures au niveau du gyrus denté suite à une exposition au plomb (Jaako-Movitz *et al.* 2005). Ces résultats sur le processus de différenciation neuronale aux stades postnatals doivent cependant être confirmés par l'étude d'autres marqueurs, tels que les marqueurs MAP-2 et Tuj1 pour les neurones immatures et les marqueurs NeuN, Calretinine et la Calbindine pour les neurones matures.

4.3.3 Neurogenèse adulte

Chez les animaux exposés *in utero* jusqu'à l'âge de deux mois, le BrdU a été injecté 48 et 24 heures avant le sacrifice des animaux afin de marquer plusieurs cycles cellulaires. Le double marquage BrdU/NeuN a permis d'étudier le devenir de ces cellules en division cellulaire en déterminant le pourcentage de cellules nouvellement formées devenant des neurones matures. Les analyses ne montrent pas de différence significative, ni du nombre de cellules ayant incorporé le BrdU, ni du nombre de cellules doublement marquées BrdU/NeuN entre le groupe témoin et les groupes exposés. En se basant sur ces résultats, nous pouvons en conclure que l'uranium ne modifie pas la division cellulaire des progéniteurs neuronaux ainsi que le nombre de cellules nouvellement formées devenant des neurones matures au niveau de la couche des cellules granulaires du gyrus denté. De façon similaire à notre étude, une exposition au plomb débutant dès le stade *in utero* n'a pas non plus mis en évidence de modification de la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe des rats âgés de 4 mois. Cependant, suite à cette exposition, une diminution de la survie des cellules dans l'hippocampe est observée chez les animaux exposés au plomb (Gilbert *et al.* 2005). Une autre étude montre que l'exposition au plomb à partir de la gestation entraîne également une diminution de la survie des cellules nouvellement formées cette fois ci associée à une diminution de la prolifération cellulaire dans le gyrus denté des rats âgés de 2 mois (Verina *et al.* 2007). Enfin, une exposition au plomb à partir de la naissance jusqu'au stade P30 induit également une diminution de la prolifération cellulaire dans le gyrus denté des rats âgés de 3 mois. Par conséquent, pour compléter nos premiers résultats, il serait nécessaire de déterminer si l'uranium affecte la survie des cellules matures, en utilisant différents protocoles d'injection de BrdU avant le sacrifice des animaux ainsi que d'autres marqueurs de prolifération cellulaire comme le Ki67 ou le PCNA qui marquent l'ensemble du cycle cellulaire.

Nous avons également étudié le marquage des cellules contenant de la doublecortine. Nos observations ont mis en évidence un marquage discontinu au niveau de la zone sous granulaire et de la couche moléculaire du gyrus denté, ainsi qu'une diminution du marquage au niveau de la couche des cellules granulaires et de la zone sous granulaire du gyrus denté des animaux exposés à l'uranium aux deux concentrations. Ces résultats méritent d'être confirmés par des analyses morphologique et stéréologique associées à l'étude d'expression de la protéine afin de déterminer si la réduction du marquage observée est due à une diminution du nombre de cellules contenant la doublecortine ou à une diminution de l'expression de la doublecortine et/ou une diminution de la croissance dendritique. Cependant, pour appuyer nos résultats, il a été précédemment montré une diminution d'expression de la doublecortine au niveau du cortex cérébral au stade adulte suite à une exposition au plomb pendant 4 et 6 mois sans modification de la prolifération ni de la mort cellulaire (Huang *et al.* 2012). Dans une autre étude après exposition au plomb à partir de la gestation, une morphologie dendritique aberrante avec une diminution de la densité et de la longueur des dendrites apicales des neurones immatures dont la doublecortine est marquée au niveau du gyrus denté de rats adultes a été observée (Verina *et al.* 2007). Enfin, l'exposition au plomb à partir de la naissance jusqu'au stade P30 entraîne également une diminution de la différenciation en neurones matures et une augmentation du pool de neurones immatures exprimant le Tuj1 dans le gyrus denté des rats âgés de 3 mois (Jaako Movitz *et al.* 2005). Enfin, une accélération de la différenciation du pool de cellules indifférenciées a été suggérée après une exposition à un stress entraînant une diminution de l'expression de la doublecortine (Kutsuna *et al.* 2012) et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation (Rojas *et al.* 2010).

En conclusion, l'ensemble de nos résultats nous permettent de répondre à la question posée en mettant en évidence pour la première fois qu'une exposition à l'uranium dès le stade *in utero* entraîne des modifications dans les processus de la neurogenèse au cours du développement. Aux stades prénatals, l'exposition à l'uranium entraîne une inhibition du processus de mort cellulaire et une stimulation de la division cellulaire dans le neuroépithélium denté alors qu'elle entrainerait une amplification du processus de mort cellulaire et une réduction de la division cellulaire dans le gyrus denté après la naissance. Suite à cette exposition, l'induction vers la voie de différenciation neuronale est inhibée aux stades prénatals, sans modification dans la différenciation terminale aux stades prénatals. De plus, une augmentation du nombre de neurones immatures est observée au stade postnatal tardif. Les résultats obtenus au stade adulte permettent de conclure que l'uranium agit comme un inhibiteur de la différenciation neuronale. Au cours du développement, comme à l'âge adulte, les effets sur les processus de la neurogenèse sont principalement observés à la plus forte concentration d'uranium (120 mg/L). Alors que des modifications très ponctuelles sur les processus de mort cellulaire et de différenciation neuronale sont observées suite à une exposition à la

concentration de 40 mg/L, le processus de prolifération cellulaire ne semble pas impacté à cette concentration. L'uranium à la concentration de 40 mg/L n'entraîne donc pas des effets significatifs sur le processus de neurogenèse. À cette concentration, des mécanismes de protection peuvent être mis en place afin d'inhiber ou d'atténuer les effets de l'uranium, mécanismes qui ne seraient plus efficaces à plus forte concentration.

Une question essentielle reste néanmoins à élucider. Les modifications au cours du développement sont observées alors que l'uranium n'est pas retrouvé dans le cerveau des animaux (E13 à P21). Par conséquent, comment l'uranium agit-il au cours du développement ? Au vu de nos résultats, un effet direct semble être à exclure. Un effet indirect de l'uranium sur le cerveau *via* l'exposition de la mère reste donc complètement à explorer. Chez l'adulte, l'uranium se retrouve en quantité non négligeable dans les cerveaux des rats exposés et pourrait donc avoir une action locale sur le cerveau. Cependant, comme pour les animaux en cours de développement, des études sont à entreprendre afin de déterminer comment l'uranium agit sur les processus de neurogenèse.

4.4 Quelles peuvent être les conséquences neurophysiologiques suite aux modifications observées dans les processus de neurogenèse ?

Nos résultats sont les premiers sur ce modèle d'exposition et restent évidemment à confirmer et à approfondir. Cependant nous pouvons émettre un certains nombres d'hypothèses sur les possibles conséquences des modifications observées suite à cette exposition, et plusieurs pistes pour y répondre.

4.4.1 Troubles de la neurogenèse et morphologie du cerveau

Premièrement, malgré ces modifications dans les processus de neurogenèse au cours de la période périnatale, la morphologie structurale du cerveau ne semble pas altérée, au moins d'un point de vue macroscopique, aussi bien au cours du développement prénatal qu'au cours du développement postnatal et même chez les rats âgés de 2 mois. Les données de la littérature ne décrivent pas non plus de malformation cérébrale même après exposition à de plus fortes concentrations et suite à l'injection d'uranium ([Patternain et al. 1989](#), [Bosque et al. 1993](#), [Domingo 2001](#)). Une seule étude rapporte le cas d'exencéphalie, malformation uniquement observée sur un animal exposé à l'uranium à 5 mg/kg/jour ([Domingo et al. 1989](#)). Nous pouvons donc émettre deux hypothèses : soit les modifications ponctuelles observées dans les processus de neurogenèse ne sont pas suffisantes pour entraîner des malformations cérébrales ; soit les processus de prolifération cellulaire et de différenciation neuronale étant régulés par de nombreuses autres voies de signalisation, ces

dernières pourraient être stimulées en réponse à la perturbation des voies de signalisation Wnt ou Notch, participant au retour « à la normale » du développement cérébral.

Bien qu'aucune malformation au niveau macroscopique n'ait été observée, il ne faut pas exclure de possibles dysfonctionnements dans l'organisation fine des réseaux neuronaux. Il est donc nécessaire d'explorer les dernières étapes de la neurogenèse, à savoir la croissance axonale et dendritique et la formation des synapses. Quand les neurones immatures ont atteint leur destination finale, ils commencent à établir des neurites, qui deviendront les futurs axones et dendrites leur permettant de se connecter aux autres neurones et ainsi former un réseau neuronal. Pendant la croissance axonale, de nombreuses molécules servent de guide afin que les axones atteignent leur cible. L'étude de ces molécules, telles que le synaptic cell adhesion molecule (SynCAM5), les éphrines, les neurexines ou les cadhérines, permettra de déterminer si l'uranium peut affecter cette étape de la neurogenèse (Shapiro *et al.* 2007). En parallèle, des analyses de marqueurs que nous avons commencés à étudier au cours de ma thèse doivent être également entreprises, comme la GAP43, marqueur de la croissance axonale. La doublecortine joue un rôle crucial dans la stabilisation des microtubules (Gleeson *et al.* 1999) et la translocation nucléaire pendant la migration neuronale (Koizumi *et al.* 2006). La réduction du marquage de la doublecortine que nous observons pourrait donc impacter le processus de migration des cellules nouvellement formées. D'autres marqueurs de migration sont donc à étudier, tels que les lectines et leurs ligands et les glycoprotéines qui favorisent le contact entre les neurones et les cellules gliales radiales, facilitant la migration (Lehmann *et al.* 1990).

La dernière étape du processus de neurogenèse est la formation des synapses, indispensables à la transmission des informations. Des protéines, comme la synaptophysine et la synapsine pourront être analysées pour explorer cette étape. La fonctionnalité des nouveaux neurones passe par leur capacité à établir des connexions synaptiques appropriées au sein des réseaux neuronaux afin de transmettre les informations. Le transfert d'informations est modulable selon des échelles de temps allant de la milliseconde à plusieurs heures, voire des jours : c'est le phénomène de plasticité synaptique. La plasticité synaptique au sein de l'hippocampe est à la base des capacités d'apprentissage et de mémoire et est modulée en fonction de l'environnement et de l'expérience. Les cellules exprimant la doublecortine ont été décrites comme étant associées à la plasticité synaptique (Bloch *et al.* 2011) et ont une fonction importante dans l'apprentissage (Vukovi *et al.* 2013). Les neurones immatures nouvellement formés, incluant ceux qui expriment la doublecortine, participent à l'amélioration de l'apprentissage et de la mémoire car ces cellules sont plus excitables (Karl *et al.* 2005) et ont un seuil d'activation et d'induction de la PLT (potentialisation à long terme) plus faible et sont donc plus facilement excitables que les neurones matures (Schmidt-Hieber *et al.* 2004, Cheng *et al.* 2011). La réduction du marquage de la doublecortine que nous observons pourrait être à l'origine de per-

turbations au niveau de la plasticité synaptique et conduire à des perturbations dans les processus d'apprentissage et de mémoire.

Des modifications dans la croissance et la morphologie axonale des cellules granulaires du gyrus denté pourraient également affecter l'établissement des contacts synaptiques avec les neurones de la région CA3 de l'hippocampe. Dans notre étude, nous montrons également qu'une exposition à l'uranium au cours du développement entraîne chez certains animaux une désorganisation cellulaire au niveau de la région CA3 de l'hippocampe. Cette désorganisation cellulaire pourrait être due à un défaut de migration survenu au cours du développement. Une désorganisation dans l'établissement des contacts synaptiques peuvent être à l'origine de perturbations dans la transmission des informations et entraîner des troubles dans la génération des activités oscillatoires, qui sont associées aux fonctions d'apprentissage. Des études préliminaires des propriétés neurophysiologiques ont été entreprises au laboratoire afin d'étudier les activités neuronales au niveau de l'hippocampe. Plus particulièrement, les activités β/γ , connues pour être impliquées dans les fonctions cognitives et l'apprentissage et la mémoire (Fries *et al.* 2001, Pesaran *et al.* 2002), ont été analysées. Une étude préliminaire dans la région CA3 de l'hippocampe de rats exposés à partir de la naissance jusqu'à l'âge de 2 mois suggère des perturbations dans les activités β/γ (Dinocourt *et al.* 2015), notamment décrites pour être impliquées dans la reconnaissance d'objets (Steullet *et al.* 2010).

4.4.2 Troubles de la neurogenèse et perturbation de la mémoire spatiale et de la dépression

Les données de la littérature ont montré que la neurogenèse hippocampique joue un rôle dans la formation de la mémoire spatiale et épisodique (Eichenbaum *et al.* 1999), que la formation de nouveaux neurones favorise la plasticité synaptique (Van Praag *et al.* 2002, Snyder *et al.* 2005) et contribue à l'amélioration de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe (Shors *et al.* 2001, Shors *et al.* 2002, Madsen *et al.* 2003). Au contraire, des lésions au niveau du gyrus denté induisant une diminution du processus de neurogenèse provoquent des troubles de la mémoire spatiale chez le rat (McNaughton *et al.* 1989, Xavier *et al.* 1999, Ferbinteanu *et al.* 1999). Plus récemment, l'implication de la neurogenèse hippocampique dans les troubles émotionnels et plus particulièrement dans la dépression a été mise en évidence. La dépression, ainsi qu'une diminution de la neurogenèse hippocampique, conduisent à une diminution du volume de l'hippocampe (Fotuhi *et al.* 2012). Cependant, les mécanismes d'action impliquant la neurogenèse hippocampique et la dépression sont encore mal connus. Ainsi, il est difficile d'établir si la dépression a un effet négatif sur le processus de neurogenèse ou si une diminution de la neurogenèse induit un comportement dépressif. Expérimentalement, des études sur des modèles d'animaux déprimés, ont mis en évidence une di-

minution de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté ainsi que des perturbations dans la différenciation neuronale (Roni *et al.* 2015, Wang *et al.* 2008).

Les effets d'autres composés neurotoxiques, comme les métaux lourds, ont été analysés sur le processus de neurogenèse (Gilbert *et al.* 2005, Jaako-Movitz *et al.* 2005, Verina *et al.* 2007). D'autres études ont exploré les effets d'une exposition de ces métaux lourds sur les fonctions cérébrales (Kuhlmann *et al.* 1997, Yang *et al.* 2003, Jarup *et al.* 2003). Cependant, un lien direct entre les troubles de la neurogenèse et l'induction des perturbations comportementales n'est pas clairement démontré. Des travaux sur les effets d'une exposition à des radiations ionisantes pendant le développement cérébral ont cependant démontré des altérations des capacités cognitives et du processus de neurogenèse. En effet, une irradiation à forte dose (8 Gy) au niveau du cerveau entier à P14 entraîne une réduction de la prolifération cellulaire et de la différenciation neuronale dans le gyrus denté des animaux à l'âge de 4 mois, associées à une augmentation de l'anxiété et de l'apprentissage (Roughton *et al.* 2012). Suite à une irradiation au stade néonatal à faibles doses, des troubles dans l'apprentissage de rats âgés de 2 et 4 mois ont été associés à une diminution de la prolifération cellulaire et de la différenciation neuronale, ainsi qu'à des troubles de la plasticité synaptique (Kempft *et al.* 2014). De plus, une irradiation à faibles doses (0,5 à 1 Gy) aux stades prénatals conduit des troubles de la mémoire spatiale associés à une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération cellulaire dans l'hippocampe des animaux à l'âge adulte (Verreet *et al.* 2015). L'ensemble de ces données permettent donc d'établir un lien entre perturbations de la neurogenèse hippocampique et troubles de fonctions comportementales observées après irradiation. Qu'en est-il pour une exposition à l'uranium au cours du développement ?

Dans notre modèle d'exposition débutant dès le stade *in utero* et durant toute la vie, une augmentation de l'état dépressif des rats P21 exposés à l'uranium à 120 mg/L a été observée sans modification de la mémoire spatiale, ni des activités locomotrice ou exploratrice. Si l'exposition perdure jusqu'à l'âge adulte, une augmentation de l'état dépressif des rats exposés à 40 et à 120 mg/L ainsi qu'une diminution de la mémoire spatiale des rats exposés à l'uranium à 120 mg/L ont été observées. Un état hyperactif avait également été décrit chez des rats âgés de 5 et 9 mois exposés à l'uranium enrichi pendant la gestation et la lactation (Houpert *et al.* 2007).

La neurogenèse peut être modulée de façon positive en réponse à un environnement approprié ou à des composés chimiques. Si une perturbation de la neurogenèse est en partie responsable des troubles cognitifs et émotionnels observés suite à une exposition à l'uranium, une induction médicamenteuse ou fonctionnelle de la neurogenèse pourrait rétablir les effets comportementaux. Il est bien connu que l'exposition à un environnement enrichi ou une stimulation intellectuelle par apprentissage favorise le processus de neurogenèse. La restauration de ce processus est capable

d'induire un retour à la normale des effets comportementaux. Le facteur neurotrophique brain derived neurotrophic factor (BDNF) est connu pour jouer un rôle dans la physiopathologie de la dépression. Il joue un rôle positif dans la neurogenèse en favorisant la différenciation et la maturation des cellules nouvellement formées dans la zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Waterhouse *et al.* 2012). Une induction de la dépression chez des animaux par inhibition de ce facteur entraîne une diminution de la survie des cellules et de la prolifération cellulaire. La présence d'un environnement enrichi induit un retour à la normale des fonctions comportementales et de l'état dépressif des animaux (Jha *et al.* 2011). De plus, suite à une intoxication au plomb, les troubles cognitifs et moléculaires observés retrouvent un état normal par la présence d'un environnement enrichi. En effet, l'environnement enrichi permet de rétablir le taux d'expression génique du récepteur de la NMDA ainsi qu'une induction du facteur BDNF associé au retour à la normale de la mémoire spatiale (Guilarte *et al.* 2003). Par conséquent, la restauration des fonctions de mémorisation par la présence d'un environnement enrichi suite à l'intoxication au plomb est médiée par une augmentation de la neurogenèse. De la même façon, les troubles comportementaux induits par une exposition à l'uranium pourraient être réversés par une augmentation physiologique de la neurogenèse. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait donc exposer les animaux à un environnement enrichi après arrêt de l'exposition à l'uranium afin de voir si les effets comportementaux persistent. De plus, une exposition à un environnement enrichi en parallèle à l'exposition à l'uranium pourrait réduire l'action de l'uranium sur le comportement. Même si la neurogenèse hippocampique ne semble pas être impliquée dans tous les états dépressifs, elle joue un rôle important dans les mécanismes d'action des antidépresseurs et donc dans les origines et les traitements de la dépression. Le développement de certains médicaments antidépresseurs repose sur des effets au niveau de la neurogenèse et notamment sur les processus de prolifération cellulaire et de différenciation neuronale. Les antidépresseurs les plus utilisés sont les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI) qui augmentent le taux de sérotonine au niveau pré-synaptique. L'augmentation de la sérotonine dans la fente synaptique stimule la production du facteur BDNF qui induit l'augmentation de la neurogenèse par des effets sur la survie, la prolifération et la maturation des neurones (Vaidyo *et al.* 1997). Expérimentalement, l'administration d'antidépresseurs favorise le retour à la normale de la neurogenèse hippocampique. Au contraire, une ablation de la neurogenèse hippocampique inhibe l'efficacité des antidépresseurs (Santarelli *et al.* 2003). De plus, l'exposition à un stress réduit la prolifération des progéniteurs neuronaux qui est contrecarrée par l'administration d'antidépresseurs (David *et al.* 2010). Les antidépresseurs ont différentes actions, notamment sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Varghese *et al.* 2001). Cependant, une étude a démontré que l'augmentation de la neurogenèse seule était suffisante pour contrecarrer les effets sur la dépression (Hill *et al.* 2015). Dans notre étude, il serait donc intéressant d'étudier si l'administration d'antidépresseurs induit le retour à la normale de l'état émotionnel de nos animaux.

L'ensemble de ces études montre qu'une stimulation du processus de la neurogenèse provoque un retour à la normale des effets comportementaux induits par les métaux lourds ou une pathologie. Même si nous pouvons émettre l'hypothèse que, suite à une exposition à l'uranium, les modifications des processus de neurogenèse peuvent être associées aux modifications comportementales observées, les résultats accumulés au cours de ma thèse sur la neurogenèse ne permettent pas à eux seuls de faire une corrélation directe. Les futures études décrites dans les paragraphes précédents qui seront entreprises notamment sur la mise en place des réseaux neuronaux, la plasticité synaptique et les activités oscillatoires associées aux fonctions d'apprentissage et de mémoire suite à une exposition d'uranium au cours du développement, permettront d'obtenir des données suffisantes pour consolider notre hypothèse. De plus, la série de tests comportementaux classiques qui a été choisie permettait, dans un premier temps, d'explorer de potentiels changements comportementaux chez les animaux contaminés à l'uranium. Des tests plus spécifiques devront être également mis en place afin de consolider les premiers résultats obtenus, comme par exemple la piscine de Morris ([Vorhees and Williams 2006](#)).

Les mécanismes d'action de l'uranium sur les fonctions cérébrales sont complexes et semblent être multifactoriels. En effet, des études précédentes ont mis en évidence des effets de l'uranium sur les systèmes cholinergique, adrénergique, sérotoninergique ou de la balance pro ou antioxydante ([Bussy et al. 2006](#), [Benssoussan et al. 2009](#)). Les origines de la dépression sont diverses et impliquent le système sérotoninergique. En effet, une diminution du taux de sérotonine peut également être à l'origine de troubles dépressifs ([Mahar et al. 2014](#)). Suite à une exposition à l'uranium au cours du développement, aucune étude ne s'est intéressée au système sérotoninergique. Néanmoins, à l'âge adulte, une étude expérimentale a montré que l'uranium était capable d'entraîner une perturbation du métabolisme de la sérotonine ([Bussy et al. 2006](#)). Le taux de sérotonine est également impliqué dans le processus de neurogenèse. En effet, une déplétion du taux de sérotonine dans le gyrus denté entraîne une diminution du nombre de cellules nouvellement formées ([Brezun et Daszuta 2000](#)). Ces données suggèrent l'implication de la neurogenèse et de la sérotonine dans les effets dépressifs. De plus, suite à une exposition débutant à la naissance et jusqu'à l'âge de deux mois, des troubles dans la reconnaissance d'objets, de l'anxiété et de la dépression associés à des perturbations dans la balance pro ou antioxydante et du système cholinergique ont été observés ([Lestaevel et al. 2013](#), [Lestaevel et al. 2015](#)). Enfin, il ne faut pas non plus exclure qu'un trouble du comportement des jeunes rats et des rats adultes pourrait être lié à des troubles comportementaux chez la mère liés à un stress, une augmentation de l'anxiété ou de la dépression ([Satyanarayana et al. 2011](#)). Ainsi, les effets que nous avons mis en évidence sur le comportement des rats et notamment sur l'état dépressif peuvent être liés à l'induction d'un stress chez la femelle gestante ou pendant l'allaitement par l'exposition à l'uranium. Même si des données internes au laboratoire n'ont pas mis en évidence

d'effets comportementaux chez la femelle adulte suite à une exposition à l'uranium, des études plus approfondies sont à entreprendre sur le maternage effectué par la mère.

5 Conclusion

L'objectif de ma thèse était d'évaluer les effets d'une exposition à l'uranium chez le rongeur dès le stade *in utero* sur les processus de la neurogenèse au cours du développement et à l'âge adulte. Nos résultats ont pour la première fois mis en évidence qu'une exposition à l'uranium au cours du développement induisait des modifications dans les processus de la neurogenèse hippocampique, qui peuvent être associées à des troubles cognitifs et émotionnels à l'âge adulte. Plus particulièrement, nous avons observé i) des effets opposés dans les processus de mort et de prolifération cellulaire entre les stades prénatals et postnatals, ii) des modifications dans la voie de différenciation neuronale à tous les stades postnatals et adulte. Ces résultats expérimentaux démontrent que le cerveau en développement est sensible à l'uranium et sont à mettre en perspective avec l'absence de données épidémiologiques disponibles sur les effets de l'uranium suite à une exposition *in utero*. De plus, une altération dans les processus neurogéniques est impliquée dans la physiopathologie de maladies à fortes prévalences comme la dépression ou les maladies neurodégénératives. Les résultats obtenus pendant ma thèse ouvrent donc des perspectives sur d'autres pistes à explorer sur les modes d'actions de l'uranium qui constituent un enjeu majeur en matière de santé publique.

Bibliographie

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease* 37(1), 13-25.
- Ables, J. L., Breunig, J. J., Eisch, A. J., and Rakic, P. (2011). Not(ch) just development : Notch signalling in the adult brain. *Nature reviews. Neuroscience* 12(5), 269-83.
- Abou-Donia, M. B., Dechkovskaia, A. M., Goldstein, L. B., Shah, D. U., Bullman, S. L., and Khan, W. A. (2002). Uranyl acetate-induced sensorimotor deficit and increased nitric oxide generation in the central nervous system in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 72(4), 881-90.
- Abrous, D. N., Adriani, W., Montaron, M. F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., and Piazza, P. V. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(9), 3656-62.
- Abrous, D. N., Koehl, M., Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis : from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85(2) :523-69.
- AFFSA (2010). Avis relatif à la détermination d'une exigence de qualité en uranium pondéral dans les eaux destinées à la consommation humaine doi.
- Albina, M. L., Belles, M., Linares, V., Sanchez, D. J., and Domingo, J. L. (2005). Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology* 215(1-2), 69-79.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., and Soriano, E. (1998). Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(19), 7779-99.
- 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(4), 433-57.
- Altman, J. (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Experimental neurology* 16(3), 263-78.
- Altman, J., and Bayer, S. A. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *The Journal of comparative neurology* 301(3), 343-64.
- Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology* 124(3), 319-35.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S., and Del Grande, P. (2000). Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience letters* 286(1), 21-4.
- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S., and Cuppini, R. (2004). Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience letters* 359(1-2), 13-6.
- Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., and Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41(6), 881-90.
- Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T., Fishell, G., and Heintz, N. (2005). Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells. *Genes & development* 19(9), 1028-33.

- Archer, V. E., Renzetti, A. D., Doggett, R. S., Jarvis, J. Q., and Colby, T. V. (1998). Chronic diffuse interstitial fibrosis of the lung in uranium miners. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 40(5), 460-74.
- Arfsten, D. P., Wilfong, E. R., Bekkedal, M. Y., Johnson, E. W., McInturf, S. M., Eggers, J. S., Schaeffer, D. J., and Still, K. R. (2007). Evaluation of the effect of implanted depleted uranium (DU) on adult rat behavior and toxicological endpoints. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 70(23), 1995-2010.
- Arnault, E., Doussau, M., Pesty, A., Gouget, B., Van der Meeren, A., Fouchet, P., and Lefevre, B. (2008). Natural uranium disturbs mouse folliculogenesis in vivo and oocyte meiosis in vitro. *Toxicology* 247(2-3), 80-7.
- Artegiani, B., Lindemann, D., and Calegari, F. (2011). Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain. *The Journal of experimental medicine* 208(5), 937-48.
- Atlas, M., and Bond, V. P. (1965). The cell generation cycle of the eleven-day mouse embryo. *The Journal of cell biology* 26(1), 19-24.
- ATSDR (2013). Toxicological Profile for Uranium Public health service Atlanta doi.
- Backman, M., Machon, O., Mygland, L., van den Bout, C. J., Zhong, W., Taketo, M. M., and Krauss, S. (2005). Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Developmental biology* 279(1), 155-68.
- Bagri, A., Cheng, H. J., Yaron, A., Pleasure, S. J., and Tessier-Lavigne, M. (2003). Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113(3), 285-99.
- Barber, D. S., Ehrich, M. F., and Jortner, B. S. (2005). The effect of stress on the temporal and regional distribution of uranium in rat brain after acute uranyl acetate exposure. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 68(2), 99-111.
- Barber, D. S., Hancock, S. K., McNally, A. M., Hinckley, J., Binder, E., Zimmerman, K., Ehrich, M. F., and Jortner, B. S. (2007). Neurological effects of acute uranium exposure with and without stress. *Neurotoxicology* 28(6), 1110-9.
- Barry, G., Piper, M., Lindwall, C., Moldrich, R., Mason, S., Little, E., Sarkar, A., Tole, S., Gronostajski, R. M., and Richards, L. J. (2008). Specific glial populations regulate hippocampal morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(47), 12328-40.
- Bayer, S. A. (1980a). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *The Journal of comparative neurology* 190(1), 87-114.
- Bayer, S. A. (1980b). Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *The Journal of comparative neurology* 190(1), 115-34.
- Bayer, S. A., and Altman, J. (1990). Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Experimental neurology* 107(1), 48-62.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., and Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14(1), 83-144.
- Belles, M., Albina, M. L., Linares, V., Gomez, M., Sanchez, D. J., and Domingo, J. L. (2005). Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects. *Toxicology letters* 158(3), 176-85.
- Benitez, M. A., Mendez-Armenta, M., Montes, S., Rembao, D., Sanin, L. H., and Rios, C. (2009). Mother-fetus transference of lead and cadmium in rats : involvement of metallothionein. *Histology and histopathology* 24(12), 1523-30.
- Bensoussan, H., Grancolas, L., Dhieux-Lestaevel, B., Delissen, O., Vacher, C. M., Dublineau, I., Voisin, P., Gourmelon, P., Taouis, M., and Lestaevel, P. (2009). Heavy metal uranium affects the brain

- cholinergic system in rat following sub-chronic and chronic exposure. *Toxicology* 261(1-2), 59-67.
- Bertrand, N., Castro, D. S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nature reviews. Neuroscience* 3(7), 517-30.
- Beukelaers, P., Vandenbosch, R., Caron, N., Nguyen, L., Moonen, G., and Malgrange, B. (2012). Cycling or not cycling : cell cycle regulatory molecules and adult neurogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(9), 1493-503.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., and Kuhn, H. G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience letters* 291(1), 17-20.
- Blaschke, A. J., Weiner, J. A., and Chun, J. (1998). Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 396(1), 39-50.
- Bloch, J., Kaeser, M., Sadeghi, Y., Rouiller, E. M., Redmond, D. E., Jr., and Brunet, J. F. (2011). Doublecortin-positive cells in the adult primate cerebral cortex and possible role in brain plasticity and development. *The Journal of comparative neurology* 519(4), 775-89.
- Boice, J. D., Jr., Cohen, S. S., Mumma, M. T., Chadda, B., and Blot, W. J. (2008). A cohort study of uranium millers and miners of Grants, New Mexico, 1979-2005. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 28(3), 303-25.
- Boice, J. D., Jr., Mumma, M., Schweitzer, S., and Blot, W. J. (2003). Cancer mortality in a Texas county with prior uranium mining and milling activities, 1950-2001. *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection* 23(3), 247-62.
- Boice, J. D., Jr., Mumma, M. T., and Blot, W. J. (2007). Cancer and noncancer mortality in populations living near uranium and vanadium mining and milling operations in Montrose County, Colorado, 1950-2000. *Radiation research* 167(6), 711-26.
- Born, J., DeKloet, E. R., Wenz, H., Kern, W., and Fehm, H. L. (1991). Gluco- and antimineralocorticoid effects on human sleep : a role of central corticosteroid receptors. *The American journal of physiology* 260(2 Pt 1), E183-8.
- Bosque, M. A., Domingo, J. L., Llobet, J. M., and Corbella, J. (1993). Embryotoxicity and teratogenicity of uranium in mice following subcutaneous administration of uranyl acetate. *Biological trace element research* 36(2), 109-18.
- Boukhenfouf, W. and Boucenna A. (2012). Uranium content and dose assessment for phosphate fertiliser and soil samples : comparison of uranium concentration between virgin soil and fertilised soil. *Radiat Prot Dosimetry* 148(2) :263-7.
- Brandt, M. D., Hubner, M., and Storch, A. (2012). Brief report : Adult hippocampal precursor cells shorten S-phase and total cell cycle length during neuronal differentiation. *Stem Cells* 30(12), 2843-7.
- Brazel, C. Y., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., and Levison, S. W. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress in neurobiology* 69(1), 49-69.
- Bressler, J. P., Olivi, L., Cheong, J. H., Kim, Y., and Bannona, D. (2004). Divalent metal transporter 1 in lead and cadmium transport. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012, 142-52.
- Brezun, J. M., and Daszuta, A. (2000). Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *The European journal of neuroscience* 12(1), 391-6.
- Briner W and Abboud B. 2002. Behavior of juvenile mice chronically exposed to depleted uranium. In : Khassanova L, Collery Ph, Maynard I, Khassanova Z, Etienne JC, editors. *Metal Ions in Biology and Medicine*, Paris : John Libby Eurotext. p 353-356.

- Briner, W., and Murray, J. (2005). Effects of short-term and long-term depleted uranium exposure on open-field behavior and brain lipid oxidation in rats. *Neurotoxicology and teratology* 27(1), 135-44.
- Bruel-Jungerman, E., Rampon, C., and Laroche, S. (2007). Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory : facts and hypotheses. *Reviews in the neurosciences* 18(2), 93-114.
- Bussy, C., Lestaevél, P., Dhieux, B., Amourette, C., Paquet, F., Gourmelon, P., and Houpert, P. (2006). Chronic ingestion of uranyl nitrate perturbs acetylcholinesterase activity and monoamine metabolism in male rat brain. *Neurotoxicology* 27(2), 245-52.
- Butt, A. M., Jones, H. C., and Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats : a developmental study. *The Journal of physiology* 429, 47-62.
- Calegari, E., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W. B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(28), 6533-8.
- Calegari, E., and Huttner, W. B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *Journal of cell science* 116(Pt 24), 4947-55.
- Cameron, H. A., and Glover, L. R. (2015). Adult neurogenesis : beyond learning and memory. *Annual review of psychology* 66, 53-81.
- Cameron, H. A., and McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 435(4), 406-17.
- Canfield, R. L., Kreher, D. A., Cornwell, C., and Henderson, C. R., Jr. (2003). Low-level lead exposure, executive functioning, and learning in early childhood. *Child neuropsychology : a journal on normal and abnormal development in childhood and adolescence* 9(1), 35-53.
- Cao, Y., Chen, A., Radcliffe, J., Dietrich, K. N., Jones, R. L., Caldwell, K., and Rogan, W. J. (2009). Post-natal cadmium exposure, neurodevelopment, and blood pressure in children at 2, 5, and 7 years of age. *Environmental health perspectives* 117(10), 1580-6.
- Castro, D. S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L. G., Hunt, C., Dolle, D., Bithell, A., Ettwiller, L., Buckley, N., and Guillemot, F. (2011). A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes & development* 25(9), 930-45.
- Ceranik, K., Zhao, S., and Frotscher, M. (2000). Development of the entorhino-hippocampal projection : guidance by Cajal-Retzius cell axons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 911, 43-54.
- Checkoway, H., Pearce, N., Crawford-Brown, D. J., and Cragle, D. L. (1988). Radiation doses and cause-specific mortality among workers at a nuclear materials fabrication plant. *American journal of epidemiology* 127(2), 255-66.
- Chen, H., Thiagalingam, A., Chopra, H., Borges, M. W., Feder, J. N., Nelkin, B. D., Baylin, S. B., and Ball, D. W. (1997). Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer : a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(10), 5355-60.
- Cheng, X., Li, Y., Huang, Y., Feng, X., Feng, G., and Xiong, Z. Q. (2011). Pulse labeling and long-term tracing of newborn neurons in the adult subgranular zone. *Cell research* 21(2), 338-49.
- Chenn, A., and Walsh, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297(5580), 365-9.
- Chisolm, J. C., and Handorf, C. R. (1987). Increased absorption of and sensitivity to cadmium during late pregnancy : is there a relationship between markedly decreased maternal cadmium bin-

- ding protein (metallothionein) and pregnancy-induced hypertension? *Medical hypotheses* 24(4), 347-51.
- Cocas, L., and Pleasure, S. J. (2014). Wrong place, wrong time : ectopic progenitors cause cortical heterotopias. *Nature neuroscience* 17(7), 894-5.
- Cooper, J. R., Stradling, G. N., Smith, H., and Ham, S. E. (1982). The behaviour of uranium-233 oxide and uranyl-233 nitrate in rats. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 41(4), 421-33.
- Corbin, J. G., and Butt, S. J. (2011). Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Developmental neurobiology* 71(8), 710-32.
- Cowan, W. M., Fawcett, J. W., O'Leary, D. D., and Stanfield, B. B. (1984). Regressive events in neurogenesis. *Science* 225(4668), 1258-65.
- Crino, P. B., and Eberwine, J. (1996). Molecular characterization of the dendritic growth cone : regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17(6), 1173-87.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374(6524), 719-23.
- Danglot, L., Triller, A., and Marty, S. (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* 16(12), 1032-60.
- David, D. J., Wang, J., Samuels, B. A., Rainer, Q., David, I., Gardier, A. M., and Hen, R. (2010). Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 16(5), 578-91.
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassaee, M., and Cameron, H. A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 460(4), 563-72.
- Del Rio, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., and Soriano, E. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature* 385(6611), 70-4.
- Demir, M., and Laywell, E. D. (2015). Neurotoxic effects of AZT on developing and adult neurogenesis. *Frontiers in neuroscience* 9, 93.
- Derer, P., and Derer, M. (1990). Cajal-Retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. *Neuroscience* 36(3), 839-56.
- Desai, A. R., and McConnell, S. K. (2000). Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* 127(13), 2863-72.
- Desi, I., Nagymajtenyi, L., and Schulz, H. (1998). Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *Journal of applied toxicology : JAT* 18(1), 63-70.
- Diamond, G. L., Morrow, P. E., Panner, B. J., Gelein, R. M., and Baggs, R. B. (1989). Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 13(1), 65-78.
- Diaz Sylvester, P. L., Lopez, R., Ubios, A. M., and Cabrini, R. L. (2002). Exposure to subcutaneously implanted uranium dioxide impairs bone formation. *Archives of environmental health* 57(4), 320-5.
- Dickinson, M. E., Krumlauf, R., and McMahon, A. P. (1994). Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120(6), 1453-71.

- Dinocourt, C., Legrand, M., Dublineau, I., and Lestaevel, P. (2015). The neurotoxicology of uranium. *Toxicology* 337, 58-71.
- Dobrossy, M. D., Drapeau, E., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., and Abrous, D. N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis : learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Molecular psychiatry* 8(12), 974-82.
- Dobyns, W. B., Andermann, E., Andermann, F., Czapansky-Beilman, D., Dubeau, F., Dulac, O., Guerrini, R., Hirsch, B., Ledbetter, D. H., Lee, N. S., Motte, J., Pinard, J. M., Radtke, R. A., Ross, M. E., Tampieri, D., Walsh, C. A., and Truwit, C. L. (1996). X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology* 47(2), 331-9.
- 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(6), 703-16.
- Domingo, J. L. (2001). Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium : a review. *Reprod Toxicol* 15(6), 603-9.
- Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., and Corbella, J. (1987). Acute toxicity of uranium in rats and mice. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 39(1), 168-74.
- Domingo, J. L., Ortega, A., Paternain, J. L., and Corbella, J. (1989a). Evaluation of the perinatal and postnatal effects of uranium in mice upon oral administration. *Archives of environmental health* 44(6), 395-8.
- Domingo, J. L., Paternain, J. L., Llobet, J. M., and Corbella, J. (1989b). The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology* 55(1-2), 143-52.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C. A., Bertchume, A., and Csernansky, J. G. (2004). Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* 127(3), 601-9.
- Dou, C., and Zhang, J. (2011). Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. *Journal of hazardous materials* 194, 277-82.
- Drever, B. D., Riedel, G., and Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural brain research* 221(2), 505-14.
- Dribben, W. H., Creeley, C. E., and Farber, N. (2011). Low-level lead exposure triggers neuronal apoptosis in the developing mouse brain. *Neurotoxicology and teratology* 33(4), 473-80.
- Dublineau, I., Grison, S., Baudelin, C., Dudoignon, N., Souidi, M., Marquette, C., Paquet, F., Aigueperse, J., and Gourmelon, P. (2005). Absorption of uranium through the entire gastrointestinal tract of the rat. *International journal of radiation biology* 81(6), 473-82.
- Dublineau, I., Souidi, M., Gueguen, Y., Lestaevel, P., Bertho, J. M., Manens, L., Delissen, O., Grison, S., Paulard, A., Monin, A., Kern, Y., Rouas, C., Loyen, J., Gourmelon, P., and Aigueperse, J. (2014). Unexpected lack of deleterious effects of uranium on physiological systems following a chronic oral intake in adult rat. *BioMed research international* 2014, 181989.
- Duman, R. S., and Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry* 59(12), 1116-27.
- Dupret, D., Fabre, A., Dobrossy, M. D., Panatier, A., Rodriguez, J. J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olier, S. H., Piazza, P. V., and Abrous, D. N. (2007). Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology* 5(8), e214.
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., and Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells : is it spatial memory or a memory space ? *Neuron* 23(2), 209-26.
- Epp, J. R., Spritzer, M. D., and Galea, L. A. (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience* 149(2), 273-85.

- Eriksson, P., Fischer, C., Stenerlow, B., Fredriksson, A., and Sundell-Bergman, S. (2010). Interaction of gamma-radiation and methyl mercury during a critical phase of neonatal brain development in mice exacerbates developmental neurobehavioural effects. *Neurotoxicology* 31(2), 223-9.
- 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(11), 1313-7.
- Esposito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., and Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(44), 10074-86.
- Falconer, E. M., and Galea, L. A. (2003). Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats. *Brain research* 975(1-2), 22-36.
- Ferbinteanu, J., Holsinger, R. M., and McDonald, R. J. (1999). Lesions of the medial or lateral perforant path have different effects on hippocampal contributions to place learning and on fear conditioning to context. *Behavioural brain research* 101(1), 65-84.
- Ferrer, I., Serrano, T., and Soriano, E. (1990). Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development. *Neuroscience research* 8(1), 60-6.
- Feugier, A., Frelon, S., Gourmelon, P., and Claraz, M. (2008). Alteration of mouse oocyte quality after a subchronic exposure to depleted Uranium. *Reprod Toxicol* 26(3-4), 273-7.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., and Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and cellular neurosciences* 23(3), 373-82.
- Fitsanakis, V. A., Erikson, K. M., Garcia, S. J., Evje, L., Syversen, T., and Aschner, M. (2006). Brain accumulation of depleted uranium in rats following 3- or 6-month treatment with implanted depleted uranium pellets. *Biological trace element research* 111(1-3), 185-97.
- Fotuhi, M., Do, D., and Jack, C. (2012). Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature reviews. Neurology* 8(4), 189-202.
- Frelon, S., Houpert, P., Lepetit, D., and Paquet, F. (2005). The chemical speciation of uranium in water does not influence its absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Chemical research in toxicology* 18(7), 1150-4.
- Fries, P., Reynolds, J. H., Rorie, A. E., and Desimone, R. (2001). Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291(5508), 1560-3.
- Fukuda, S., Ikeda, M., Chiba, M., and Kaneko, K. (2006). Clinical diagnostic indicators of renal and bone damage in rats intramuscularly injected with depleted uranium. *Radiation protection dosimetry* 118(3), 307-14.
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L., and Grosschedl, R. (2000). Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127(3), 469-82.
- Galichet, C., Guillemot, F., and Parras, C. M. (2008). Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development* 135(11), 2031-41.
- Georg Kuhn, H., and Blomgren, K. (2011). Developmental dysregulation of adult neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 33(6), 1115-22.
- Gerber, D. J., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., Huang, S. Y., Caron, M. G., and Tonegawa, S. (2001). Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26), 15312-7.

- Geschwind, D. H., and Rakic, P. (2013). Cortical evolution : judge the brain by its cover. *Neuron* 80(3), 633-47.
- Ghosh, S., Kumar, A., Pandey, B. N., and Mishra, K. P. (2007). Acute exposure of uranyl nitrate causes lipid peroxidation and histopathological damage in brain and bone of Wistar rat. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 26(4), 255-61.
- Gil-Mohapel, J., Boehme, F., Kainer, L., and Christie, B. R. (2010). Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure : insights from different rodent models. *Brain research reviews* 64(2), 283-303.
- Gilbert, M. E., Kelly, M. E., Samsam, T. E., and Goodman, J. H. (2005). Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 86(2), 365-74.
- Gilman, A. P., Villeneuve, D. C., Secours, V. E., Yagminas, A. P., Tracy, B. L., Quinn, J. M., Valli, V. E., Willes, R. J., and Moss, M. A. (1998). Uranyl nitrate : 28-day and 91-day toxicity studies in the Sprague-Dawley rat. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 41(1), 117-28.
- Gitlin, A. D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M. C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* 509(7502), 637-40.
- 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(2), 257-71.
- Goasguen, J., Lapresle, J., Ribot, C., and Rocquet, G. (1982). [Chronic neurological syndrome resulting from intoxication with metallic uranium (author's transl)]. *La Nouvelle presse medicale* 11(2), 119-21.
- Gonzales, R. B., DeLeon Galvan, C. J., Rangel, Y. M., and Claiborne, B. J. (2001). Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *The Journal of comparative neurology* 430(3), 357-68.
- Gotz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(10), 777-88.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience* 2(3), 260-5.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., and Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(7), 2492-8.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flugge, G., and Fuchs, E. (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6), 3168-71.
- Gould, E., Woolley, C. S., and McEwen, B. S. (1991). Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *The Journal of comparative neurology* 304(3), 408-18.
- Grignard, E., Gueguen, Y., Grison, S., Lobaccaro, J. M., Gourmelon, P., and Souidi, M. (2008). In vivo effects of chronic contamination with 137 cesium on testicular and adrenal steroidogenesis. *Archives of toxicology* 82(9), 583-9.
- Gueguen, Y., Grandcolas, L., Baudelin, C., Grison, S., Tissandie, E., Jourdain, J. R., Paquet, F., Voisin, P., Aigueperse, J., Gourmelon, P., and Souidi, M. (2007). Effect of acetaminophen administration to rats chronically exposed to depleted uranium. *Toxicology* 229(1-2), 62-72.
- Gueguen, Y., Souidi, M., Baudelin, C., Dudoignon, N., Grison, S., Dublineau, I., Marquette, C., Voisin, P., Gourmelon, P., and Aigueperse, J. (2006). Short-term hepatic effects of depleted uranium

- on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Archives of toxicology* 80(4), 187-95.
- Guentchev, M., and McKay, R. D. (2006). Notch controls proliferation and differentiation of stem cells in a dose-dependent manner. *The European journal of neuroscience* 23(9), 2289-96.
- Guilarte, T. R., Toscano, C. D., McGlothan, J. L., and Weaver, S. A. (2003). Environmental enrichment reverses cognitive and molecular deficits induced by developmental lead exposure. *Annals of neurology* 53(1), 50-6.
- Gundacker, C., and Hengstschlager, M. (2012). The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals. *Wien Med Wochenschr* 162(9-10), 201-6.
- Guseva Canu, I., Garsi, J. P., Caer-Lorho, S., Jacob, S., Collomb, P., Acker, A., and Laurier, D. (2012). Does uranium induce circulatory diseases? First results from a French cohort of uranium workers. *Occupational and environmental medicine* 69(6), 404-9.
- Hairston, I. S., Little, M. T., Scanlon, M. D., Barakat, M. T., Palmer, T. D., Sapolsky, R. M., and Heller, H. C. (2005). Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *Journal of neurophysiology* 94(6), 4224-33.
- Hakanson-Hayes, A. C., Fresquez, P. R., and Whicker, F. W. (2002). Assessing potential risks from exposure to natural uranium in well water. *Journal of environmental radioactivity* 59(1), 29-40.
- Haley, D. P., Bulger, R. E., and Dobyhan, D. C. (1982). The long-term effects of uranyl nitrate on the structure and function of the rat kidney. *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology* 41(1-2), 181-92.
- Hao, Y., Li, R., Leng, Y., Ren, J., Liu, J., Ai, G., Xu, H., Su, Y., and Cheng, T. (2012). The reproductive effects in rats after chronic oral exposure to low-dose depleted uranium. *Journal of radiation research* 53(3), 377-84.
- Hao, Y., Li, R., Leng, Y., Ren, J., Liu, J., Ai, G., Xu, H., Su, Y., and Cheng, T. (2009). A study assessing the genotoxicity in rats after chronic oral exposure to a low dose of depleted uranium. *Journal of radiation research* 50(6), 521-8.
- Hartz, A. M., and Bauer, B. (2011). ABC transporters in the CNS - an inventory. *Current pharmaceutical biotechnology* 12(4), 656-73.
- Haydar, T. F., Wang, F., Schwartz, M. L., and Rakic, P. (2000). Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20(15), 5764-74.
- Hazane, F., Krebs, M. O., Jay, T. M., and Le Pen, G. (2009). Behavioral perturbations after prenatal neurogenesis disturbance in female rat. *Neurotoxicity research* 15(4), 311-20.
- Herrera, D. G., Yague, A. G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., Romero, F. J., and Garcia-Verdugo, J. M. (2003). Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism : protective effects of an antioxidant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(13), 7919-24.
- Hill, A. S., Sahay, A., and Hen, R. (2015). Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 40(10), 2368-78.
- Hinck, L., Nathke, I. S., Papkoff, J., and Nelson, W. J. (1994). Beta-catenin : a common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends in biochemical sciences* 19(12), 538-42.
- Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2005). Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neuroscience research* 51(4), 331-6.

- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131(12), 2791-801.
- Hoshino, K., Matsuzawa, T., and Murakami, U. (1973). Characteristics of the cell cycle of matrix cells in the mouse embryo during histogenesis of telencephalon. *Experimental cell research* 77(1), 89-94.
- Houpert, P., Frelon, S., Lestaevel, P., Bussy, C., Gourmelon, P., and Paquet, F. (2007a). Parental exposure to enriched uranium induced delayed hyperactivity in rat offspring. *Neurotoxicology* 28(1), 108-13.
- Houpert, P., Frelon, S., Monleau, M., Bussy, C., Chazel, V., and Paquet, F. (2007b). Heterogeneous accumulation of uranium in the brain of rats. *Radiation protection dosimetry* 127(1-4), 86-9.
- Houpert, P., Lestaevel, P., Amourette, C., Dhieux, B., Bussy, C., and Paquet, F. (2004). Effect of U and ¹³⁷Cs chronic contamination on dopamine and serotonin metabolism in the central nervous system of the rat. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 82(2), 161-6.
- Houpert, P., Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., and Gourmelon, P. (2005). Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology* 26(6), 1015-20.
- Howland, J. W. (1948). Comprehensive summary of the pharmacology and toxicology of uranium compounds ; studies on human exposures to uranium compounds. *Atomic energy in biophysics, biology and medicine* 1(5), 174.
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2001). Neurotrophins : roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24, 677-736.
- Huang, J., Huang, K., Shang, L., Wang, H., Zhang, M., Fan, C. L., Chen, D., Yan, X., and Xiong, K. (2012). Chronic lead exposure reduces doublecortin-expressing immature neurons in young adult guinea pig cerebral cortex. *BMC neuroscience* 13, 82.
- Ibanez, C., Suhard, D., Tessier, C., Delissen, O., Lestaevel, P., Dublineau, I., and Gourmelon, P. (2014). Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles. *Neuropathology and applied neurobiology* 40(4), 477-88.
- ICRP (1995). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 4 Inhalation dose coefficients. . ICRP publication doi.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(9), 3489-98.
- IRSN (2011). Bilan : La qualité radiologique de l'eau mise en distribution en France 2008-2009 doi.
- Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., and Guillemot, F. (1995). Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes & development* 9(24), 3136-48.
- Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L., and Kessler, J. A. (2004). The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Developmental biology* 268(1), 220-31.
- Jaako-Movits, K., Zharkovsky, T., Romantchik, O., Jurgenson, M., Merisalu, E., Heidmets, L. T., and Zharkovsky, A. (2005). Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 23(7), 627-35.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* 68, 167-82.

- Jett, D. A., and Guilarte, T. R. (1995). Developmental lead exposure alters N-methyl-D-aspartate and muscarinic cholinergic receptors in the rat hippocampus : an autoradiographic study. *Neurotoxicology* 16(1), 7-18.
- Jha, S., Dong, B., and Sakata, K. (2011). Enriched environment treatment reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis and protein levels of brain-derived neurotrophic factor in mice lacking its expression through promoter IV. *Translational psychiatry* 1, e40.
- Jin, K., Galvan, V., Xie, L., Mao, X. O., Gorostiza, O. F., Bredesen, D. E., and Greenberg, D. A. (2004). Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(36), 13363-7.
- Job, C., and Tan, S. S. (2003). Constructing the mammalian neocortex : the role of intrinsic factors. *Developmental biology* 257(2), 221-32.
- Johansson, P. A., Dziegielewska, K. M., Liddelow, S. A., and Saunders, N. R. (2008). The blood-CSF barrier explained : when development is not immaturity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 30(3), 237-48.
- Jusko, T. A., Henderson, C. R., Lanphear, B. P., Cory-Slechta, D. A., Parsons, P. J., and Canfield, R. L. (2008). Blood lead concentrations < 10 microg/dL and child intelligence at 6 years of age. *Environmental health perspectives* 116(2), 243-8.
- Kageyama, R., Ishibashi, M., Takebayashi, K., and Tomita, K. (1997). bHLH transcription factors and mammalian neuronal differentiation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29(12), 1389-99.
- Karl, C., Couillard-Despres, S., Prang, P., Munding, M., Kilb, W., Brigadski, T., Plotz, S., Mages, W., Luhmann, H., Winkler, J., Bogdahn, U., and Aigner, L. (2005). Neuronal precursor-specific activity of a human doublecortin regulatory sequence. *Journal of neurochemistry* 92(2), 264-82.
- Kathren, R. L., and Moore, R. H. (1986). Acute accidental inhalation of U : a 38-year follow-up. *Health physics* 51(5), 609-19.
- Kempermann, G., van Praag, H., and Gage, F. H. (2000). Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. *Progress in brain research* 127, 35-48.
- Kempermann, G., Wiskott, L., and Gage, F. H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Current opinion in neurobiology* 14(2), 186-91.
- Kempf, S. J., Casciati, A., Buratovic, S., Janik, D., von Toerne, C., Ueffing, M., Neff, F., Moertl, S., Steinerlow, B., Saran, A., Atkinson, M. J., Eriksson, P., Pazzaglia, S., and Tapio, S. (2014). The cognitive defects of neonatally irradiated mice are accompanied by changed synaptic plasticity, adult neurogenesis and neuroinflammation. *Molecular neurodegeneration* 9, 57.
- Khera, K. S. (1987). Ethylenethiourea : a review of teratogenicity and distribution studies and an assessment of reproduction risk. *Critical reviews in toxicology* 18(2), 129-39.
- Kitazawa, A., Kubo, K., Hayashi, K., Matsunaga, Y., Ishii, K., and Nakajima, K. (2014). Hippocampal pyramidal neurons switch from a multipolar migration mode to a novel "climbing" migration mode during development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34(4), 1115-26.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B. C., and Gleeson, J. G. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nature neuroscience* 9(6), 779-86.
- Koutmani, Y., Hurel, C., Patsavoudi, E., Hack, M., Gotz, M., Thomaidou, D., and Matsas, R. (2004). BM88 is an early marker of proliferating precursor cells that will differentiate into the neuronal lineage. *The European journal of neuroscience* 20(10), 2509-23.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32, 149-84.

- Kuhlmann, A. C., McGlothan, J. L., and Guilarte, T. R. (1997). Developmental lead exposure causes spatial learning deficits in adult rats. *Neuroscience letters* 233(2-3), 101-4.
- 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(6), 2027-33.
- Kundt, M. S., Martinez-Taibo, C., Muhlmann, M. C., and Furnari, J. C. (2009). Uranium in drinking water : effects on mouse oocyte quality. *Health physics* 96(5), 568-74.
- Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Makelainen, I., Vaisanen, S. B., Penttila, I. M., and Komulainen, H. (2002). Renal effects of uranium in drinking water. *Environmental health perspectives* 110(4), 337-42.
- Kurttio, P., Harmoinen, A., Saha, H., Salonen, L., Karpas, Z., Komulainen, H., and Auvinen, A. (2006). Kidney toxicity of ingested uranium from drinking water. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 47(6), 972-82.
- Kurttio, P., Komulainen, H., Leino, A., Salonen, L., Auvinen, A., and Saha, H. (2005). Bone as a possible target of chemical toxicity of natural uranium in drinking water. *Environmental health perspectives* 113(1), 68-72.
- Kutsuna, N., Suma, T., Takada, Y., Yamashita, A., Oshima, H., Sakatani, K., Yamamoto, T., and Katayama, Y. (2012). Decrease in doublecortin expression without neuronal cell death in rat retrosplenial cortex after stress exposure. *Neuroreport* 23(4), 211-5.
- la Fleur, S. E., and Serlie, M. J. (2014). The interaction between nutrition and the brain and its consequences for body weight gain and metabolism ; studies in rodents and men. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 28(5), 649-59.
- Lai, E. C. (2003). Drosophila tufted is a gain-of-function allele of the proneural gene amos. *Genetics* 163(4), 1413-25.
- Lajud, N., and Torner, L. (2015). Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate : sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. *Frontiers in molecular neuroscience* 8, 3.
- Lange, C., Huttner, W. B., and Calegari, F. (2009). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell stem cell* 5(3), 320-31.
- Lee, K. J., and Jessell, T. M. (1999). The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual review of neuroscience* 22, 261-94.
- Lee, S. M., Tole, S., Grove, E., and McMahon, A. P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127(3), 457-67.
- Leggett, R. W. (1994). Basis for the ICRP's age-specific biokinetic model for uranium. *Health physics* 67(6), 589-610.
- Leggett, R. W. (1989). The behavior and chemical toxicity of U in the kidney : a reassessment. *Health physics* 57(3), 365-83.
- Lehmann, S., Kuchler, S., Theveniau, M., Vincendon, G., and Zanetta, J. P. (1990). An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(16), 6455-9.
- Lehotzky, K., Szeberenyi, M. J., and Kiss, A. (1989). Behavioral consequences of prenatal exposure to the organophosphate insecticide sumithion. *Neurotoxicology and teratology* 11(3), 321-4.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., and Abrous, D. N. (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(20), 11032-7.

- Lemercier, V., Millot, X., Ansoborlo, E., Menetrier, F., Flury-Herard, A., Rousselle, C., and Scherrmann, J. M. (2003). Study of uranium transfer across the blood-brain barrier. *Radiation protection dosimetry* 105(1-4), 243-5.
- Lestaevel, P., Bensoussan, H., Dhieux, B., Delissen, O., Vacher, C. M., Dublineau, I., Voisin, P., and Taouis, M. (2013). Cerebral cortex and hippocampus respond differently after post-natal exposure to uranium. *The Journal of toxicological sciences* 38(5), 803-11.
- Lestaevel, P., Bussy, C., Paquet, F., Dhieux, B., Clarencon, D., Houpert, P., and Gourmelon, P. (2005a). Changes in sleep-wake cycle after chronic exposure to uranium in rats. *Neurotoxicology and teratology* 27(6), 835-40.
- Lestaevel, P., Dhieux, B., Delissen, O., Benderitter, M., and Aigueperse, J. (2015). Uranium modifies or not behavior and antioxidant status in the hippocampus of rats exposed since birth. *The Journal of toxicological sciences* 40(1), 99-107.
- Lestaevel, P., Houpert, P., Bussy, C., Dhieux, B., Gourmelon, P., and Paquet, F. (2005b). The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology* 212(2-3), 219-26.
- Lestaevel, P., Romero, E., Dhieux, B., Ben Soussan, H., Berradi, H., Dublineau, I., Voisin, P., and Gourmelon, P. (2009). Different pattern of brain pro-/anti-oxidant activity between depleted and enriched uranium in chronically exposed rats. *Toxicology* 258(1), 1-9.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., and Shors, T. J. (2004). Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(34), 7477-81.
- Lewis, J. (1996). Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 6 : 3-10.
- Li, F., Chong, Z. Z., and Maiese, K. (2005). Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Current neurovascular research* 2(4), 331-40.
- Li, S. F., Sun, Y. B., Meng, Q. H., Li, S. R., Yao, W. C., Hu, G. J., Li, Z. J., and Wang, R. Z. (2009). Recombinant adeno-associated virus serotype 1-vascular endothelial growth factor promotes neurogenesis and neuromigration in the subventricular zone and rescues neuronal function in ischemic rats. *Neurosurgery* 65(4), 771-9; discussion 779.
- Liddelw, S. A., Dziegielewska, K. M., Ek, C. J., Johansson, P. A., Potter, A. M., and Saunders, N. R. (2009). Cellular transfer of macromolecules across the developing choroid plexus of *Mono-delphis domestica*. *The European journal of neuroscience* 29(2), 253-66.
- Liebner, S., Czupalla, C. J., and Wolburg, H. (2011). Current concepts of blood-brain barrier development. *The International journal of developmental biology* 55(4-5), 467-76.
- Lin, S. C., and Bergles, D. E. (2004). Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 47(3), 290-8.
- Linares, V., Albina, M. L., Belles, M., Mayayo, E., Sanchez, D. J., and Domingo, J. L. (2005). Combined action of uranium and stress in the rat. II. Effects on male reproduction. *Toxicology letters* 158(3), 186-95.
- Liu, J., Han, D., Li, Y., Zheng, L., Gu, C., Piao, Z., Au, W. W., Xu, X., and Huo, X. (2010). Lead affects apoptosis and related gene XIAP and Smac expression in the hippocampus of developing rats. *Neurochemical research* 35(3), 473-9.
- Liu, J., and Lewis, G. (2014). Environmental toxicity and poor cognitive outcomes in children and adults. *Journal of environmental health* 76(6), 130-8.
- Llobet, J. M., Sirvent, J. J., Ortega, A., and Domingo, J. L. (1991). Influence of chronic exposure to uranium on male reproduction in mice. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 16(4), 821-9.
- Macfarlane, G. J., Biggs, A. M., Maconochie, N., Hotopf, M., Doyle, P., and Lunt, M. (2003). Incidence of cancer among UK Gulf war veterans : cohort study. *BMJ* 327(7428), 1373.

- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E., Bolwig, T. G., and Wortwein, G. (2003). Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119(3), 635-42.
- Malberg, J. E., and Duman, R. S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress : reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28(9), 1562-71.
- Malenchenko, A. F., Barkun, N. A., and Guseva, G. F. (1978). Effect of uranium on the induction and course of experimental autoimmune orchitis and thyroiditis. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology* 22(3), 268-77.
- Maynard, E. A., Randall, C., and et al. (1949). Effects of feeding uranium nitrate hexahydrate in the diets of breeding white rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 95 P(4), 421-8.
- McCormick, M. B., Tamimi, R. M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D., and Tapscott, S. J. (1996). NeuroD2 and neuroD3 : distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Molecular and cellular biology* 16(10), 5792-800.
- McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Dorsey, C. D., Oliver, M., Gucer, P., Gaitens, J. M., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Hoover, D., Gaspari, A. A., Shvartsbeyn, M., Brown, L., and Squibb, K. S. (2011). Longitudinal health surveillance in a cohort of Gulf War veterans 18 years after first exposure to depleted uranium. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 74(10), 678-91.
- McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Dorsey, C. D., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R., Gudi, R., and Squibb, K. S. (2009). Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War I veterans : sixteen years of follow-up. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 72(1), 14-29.
- McDiarmid, M. A., Engelhardt, S. M., Oliver, M., Gucer, P., Wilson, P. D., Kane, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Albertini, R. J., Gudi, R., Jacobson-Kram, D., Thorne, C. D., and Squibb, K. S. (2006). Biological monitoring and surveillance results of Gulf War I veterans exposed to depleted uranium. *International archives of occupational and environmental health* 79(1), 11-21.
- McDiarmid, M. A., Gaitens, J. M., Hines, S., Breyer, R., Wong-You-Cheong, J. J., Engelhardt, S. M., Oliver, M., Gucer, P., Kane, R., Cernich, A., Kaup, B., Hoover, D., Gaspari, A. A., Liu, J., Harberts, E., Brown, L., Centeno, J. A., Gray, P. J., Xu, H., and Squibb, K. S. (2013). The Gulf War depleted uranium cohort at 20 years : bioassay results and novel approaches to fragment surveillance. *Health physics* 104(4), 347-61.
- McDiarmid, M. A., Keogh, J. P., Hooper, F. J., McPhaul, K., Squibb, K., Kane, R., DiPino, R., Kabat, M., Kaup, B., Anderson, L., Hoover, D., Brown, L., Hamilton, M., Jacobson-Kram, D., Burrows, B., and Walsh, M. (2000). Health effects of depleted uranium on exposed Gulf War veterans. *Environmental research* 82(2), 168-80.
- McManus, M. F., and Golden, J. A. (2005). Neuronal migration in developmental disorders. *Journal of child neurology* 20(4), 280-6.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Meltzer, J., and Sutherland, R. J. (1989). Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Experimental brain research* 76(3), 485-96.
- McTigue, D. M., and Tripathi, R. B. (2008). The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *Journal of neurochemistry* 107(1), 1-19.
- Mehler, M. F. (2002). Mechanisms regulating lineage diversity during mammalian cerebral cortical neurogenesis and gliogenesis. *Results and problems in cell differentiation* 39, 27-52.

- Meneses, A., and Liy-Salmeron, G. (2012). Serotonin and emotion, learning and memory. *Reviews in the neurosciences* 23(5-6), 543-53.
- Michon, J., Frelon, S., Garnier, C., and Coppin, F. (2010). Determinations of uranium(VI) binding properties with some metalloproteins (transferrin, albumin, metallothionein and ferritin) by fluorescence quenching. *Journal of fluorescence* 20(2), 581-90.
- Miller, A. C., Brooks, K., Smith, J., and Page, N. (2004). Effect of the militarily-relevant heavy metals, depleted uranium and heavy metal tungsten-alloy on gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Molecular and cellular biochemistry* 255(1-2), 247-56.
- Miller, A. C., Xu, J., Stewart, M., Prasanna, P. G., and Page, N. (2002). Potential late health effects of depleted uranium and tungsten used in armor-piercing munitions : comparison of neoplastic transformation and genotoxicity with the known carcinogen nickel. *Military medicine* 167(2 Suppl), 120-2.
- Miller, M. W., and Nowakowski, R. S. (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain research* 457(1), 44-52.
- Minetti, A., and Reale, C. A. (2006). Sensorimotor developmental delays and lower anxiety in rats prenatally exposed to cadmium. *Journal of applied toxicology : JAT* 26(1), 35-41.
- Ming, G. L., and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual review of neuroscience* 28, 223-50.
- Mirescu, C., and Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16(3), 233-8.
- Miyama, S., Takahashi, T., Nowakowski, R. S., and Caviness, V. S., Jr. (1997). A gradient in the duration of the G1 phase in the murine neocortical proliferative epithelium. *Cereb Cortex* 7(7), 678-89.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131(13), 3133-45.
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., and Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* 8(6), 427-37.
- Monleau, M., Blanchardon, E., Claraz, M., Paquet, F., and Chazel, V. (2006a). The effect of repeated inhalation on the distribution of uranium in rats. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 69(17), 1629-49.
- Monleau, M., De Meo, M., Frelon, S., Paquet, F., Donnadiou-Claraz, M., Dumenil, G., and Chazel, V. (2006b). Distribution and genotoxic effects after successive exposure to different uranium oxide particles inhaled by rats. *Inhalation toxicology* 18(11), 885-94.
- Monleau, M., De Meo, M., Paquet, F., Chazel, V., Dumenil, G., and Donnadiou-Claraz, M. (2006c). Genotoxic and inflammatory effects of depleted uranium particles inhaled by rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 89(1), 287-95.
- Monti, J. M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep medicine reviews* 15(4), 269-81.
- Morris, R. G. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function : the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *The European journal of neuroscience* 23(11), 2829-46.
- Nacher, J., Rosell, D. R., Alonso-Llosa, G., and McEwen, B. S. (2001). NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *The European journal of neuroscience* 13(3), 512-20.
- Naik, P. and L. Cucullo (2012). In vitro blood-brain barrier models : current and perspective technologies. *J Pharm Sci* 101(4) : 1337-1354.

- Nakahira, E., and Yuasa, S. (2005). Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *The Journal of comparative neurology* 483(3), 329-40.
- Naninck, E. F., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S. E., Lucassen, P. J., and Korosi, A. (2015). Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus* 25(3), 309-28.
- Needham, L. L., Grandjean, P., Heinzow, B., Jorgensen, P. J., Nielsen, F., Patterson, D. G., Jr., Sjodin, A., Turner, W. E., and Weihe, P. (2011). Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. *Environmental science & technology* 45(3), 1121-6.
- Nieto, M., Monuki, E. S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S. J., Cunningham, J., Gotz, M., and Walsh, C. A. (2004). Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology* 479(2), 168-80.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., and Guillemot, F. (2001). Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29(2), 401-13.
- Nihei, M. K., Desmond, N. L., McGlothan, J. L., Kuhlmann, A. C., and Guilarte, T. R. (2000). N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience* 99(2), 233-42.
- Nixon, K., and Crews, F. T. (2002). Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 83(5), 1087-93.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7(2), 136-44.
- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., and Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 508(1), 28-44.
- Nowak, E., Etienne, O., Millet, P., Lages, C. S., Mathieu, C., Mouthon, M. A., and Boussin, F. D. (2006). Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiation research* 165(2), 155-64.
- Obermeier, B., Daneman, R., and Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine* 19(12), 1584-96.
- Oldekamp, J., Kraemer, N., Alvarez-Bolado, G., and Skutella, T. (2004). bHLH gene expression in the Emx2-deficient dentate gyrus reveals defective granule cells and absence of migrating precursors. *Cereb Cortex* 14(9), 1045-58.
- Oppenheim, R. W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annual review of neuroscience* 14, 453-501.
- Ormerod, B. K., Lee, T. T., and Galea, L. A. (2004). Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience* 128(3), 645-54.
- Ortega, A., Domingo, J. L., Llobet, J. M., Tomas, J. M., and Paternain, J. L. (1989). Evaluation of the oral toxicity of uranium in a 4-week drinking-water study in rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 42(6), 935-41.
- Paizanis, E., Hamon, M., and Lanfumey, L. (2007). Hippocampal neurogenesis, depressive disorders, and antidepressant therapy. *Neural plasticity* 2007, 73754.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A., and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132(2), 335-44.

- Palmer, T. D., Willhoite, A. R., and Gage, F. H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 425(4), 479-94.
- Paquet, F., Houpert, P., Blanchardon, E., Delissen, O., Maubert, C., Dhieux, B., Moreels, A. M., Frelon, S., and Gourmelon, P. (2006). Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion. *Health physics* 90(2), 139-47.
- Paquet, F. A.-G., C; Ansoborlo, E; Beaugelin-Seiller, K; Carriere, M; Dublineau I, Taran, F and Vidaud, C (2009). L'uranium. *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*. . Lavoisier 411-443.
- Pardridge, W. M. (2003). Blood-brain barrier genomics and the use of endogenous transporters to cause drug penetration into the brain. *Current opinion in drug discovery & development* 6(5), 683-91.
- Pardridge, W. M. (2012). Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32(11), 1959-72.
- Pasanen, M., Lang, S., Kojo, A., and Kosma, V. M. (1995). Effects of simulated nuclear fuel particles on the histopathology and CYP enzymes in the rat lung and liver. *Environmental research* 70(2), 126-33.
- Paternain, J. L., Domingo, J. L., Ortega, A., and Llobet, J. M. (1989). The effects of uranium on reproduction, gestation, and postnatal survival in mice. *Ecotoxicology and environmental safety* 17(3), 291-6.
- Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. E., Ejniak, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M., and Landauer, M. R. (1999). Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 49(1), 29-39.
- Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalie, I., Garnier-Laplace, J., and Adam-Guillermin, C. (2012). Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquat Toxicol* 109, 11-6.
- Pesaran, B., Pezaris, J. S., Sahani, M., Mitra, P. P., and Andersen, R. A. (2002). Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nature neuroscience* 5(8), 805-11.
- Petitot, F., Gautier, C., Moreels, A. M., Frelon, S., and Paquet, F. (2007). Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiation protection dosimetry* 127(1-4), 125-30.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., and McEwen, B. S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *The European journal of neuroscience* 17(4), 879-86.
- Pilaz, L. J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R. J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., Kennedy, H., and Dehay, C. (2009). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(51), 21924-9.
- Poisson, C., Stefani, J., Manens, L., Delissen, O., Suhard, D., Tessier, C., Dublineau, I., and Gueguen, Y. (2014). Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free radical research* 48(10), 1218-31.
- Pramparo, T., Youn, Y. H., Yingling, J., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2010). Novel embryonic neuronal migration and proliferation defects in Dcx mutant mice are exacerbated by Lis1 reduction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(8), 3002-12.
- Prat, O., Vercouter, T., Ansoborlo, E., Fichet, P., Perret, P., Kurttio, P., and Salonen, L. (2009). Uranium speciation in drinking water from drilled wells in southern Finland and its potential links to health effects. *Environmental science & technology* 43(10), 3941-6.

- Priest, N. D., Howells, G. R., Green, D., and Haines, J. W. (1982). Uranium in bone : metabolic and autoradiographic studies in the rat. *Human toxicology* 1(2), 97-114.
- Racine, R., Grandcolas, L., Grison, S., Stefani, J., Delissen, O., Gourmelon, P., Veyssiere, G., and Souidi, M. (2010). Cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) activity is modified after chronic ingestion of depleted uranium in the rat. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 120(1), 60-6.
- Rage, E., Caer-Lorho, S., Drubay, D., Ancelet, S., Laroche, P., and Laurier, D. (2015). Mortality analyses in the updated French cohort of uranium miners (1946-2007). *International archives of occupational and environmental health* 88(6), 717-30.
- Rakic, P., and Nowakowski, R. S. (1981). The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *The Journal of comparative neurology* 196(1), 99-128.
- Rao, M. S., Hattiangady, B., Abdel-Rahman, A., Stanley, D. P., and Shetty, A. K. (2005). Newly born cells in the ageing dentate gyrus display normal migration, survival and neuronal fate choice but endure retarded early maturation. *The European journal of neuroscience* 21(2), 464-76.
- Raymond-Whish, S., Mayer, L. P., O'Neal, T., Martinez, A., Sellers, M. A., Christian, P. J., Marion, S. L., Begay, C., Propper, C. R., Hoyer, P. B., and Dyer, C. A. (2007). Drinking water with uranium below the U.S. EPA water standard causes estrogen receptor-dependent responses in female mice. *Environmental health perspectives* 115(12), 1711-6.
- Rouas, C., Souidi, M., Grandcolas, L., Grison, S., Baudelin, C., Gourmelon, P., Pallardy, M., and Gueguen, Y. (2009). Acetaminophen induces xenobiotic-metabolizing enzymes in rat : Impact of a uranium chronic exposure. *Environmental toxicology and pharmacology* 28(3), 363-9.
- Roughton, K., Kalm, M., and Blomgren, K. (2012). Sex-dependent differences in behavior and hippocampal neurogenesis after irradiation to the young mouse brain. *The European journal of neuroscience* 36(6), 2763-72.
- Roy, A., Bellinger, D., Hu, H., Schwartz, J., Ettinger, A. S., Wright, R. O., Bouchard, M., Palaniappan, K., and Balakrishnan, K. (2009). Lead exposure and behavior among young children in Chennai, India. *Environmental health perspectives* 117(10), 1607-11.
- Roybon, L., Hjalt, T., Stott, S., Guillemot, F., Li, JY, Brundin, P. (2009). Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4(3), e4779.
- Rueda, D., Navarro, B., Martinez-Serrano, A., Guzman, M., and Galve-Roperh, I. (2002). The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *The Journal of biological chemistry* 277(48), 46645-50.
- Sanchez, D. J., Belles, M., Albina, M. L., Gomez, M., Linares, V., and Domingo, J. L. (2006). Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress : effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology* 228(2-3), 323-32.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., and Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301(5634), 805-9.
- Santra, M., Santra, S., Buller, B., Santra, K., Nallani, A., and Chopp, M. (2011). Effect of doublecortin on self-renewal and differentiation in brain tumor stem cells. *Cancer science* 102(7), 1350-7.
- Saunders, N. R., Liddelow, S. A., and Dziegielewska, K. M. (2012). Barrier mechanisms in the developing brain. *Frontiers in pharmacology* 3, 46.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429(6988), 184-7.
- Schultz, W. (2007). Behavioral dopamine signals. *Trends in neurosciences* 30(5), 203-10.

- Schuermans, C., and Guillemot, F. (2002). Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Current opinion in neurobiology* 12(1), 26-34.
- Selden, A. I., Lundholm, C., Edlund, B., Hogdahl, C., Ek, B. M., Bergstrom, B. E., and Ohlson, C. G. (2009). Nephrotoxicity of uranium in drinking water from private drilled wells. *Environmental research* 109(4), 486-94.
- Selevan, S. G., Rice, D. C., Hogan, K. A., Euling, S. Y., Pfahles-Hutchens, A., and Bethel, J. (2003). Blood lead concentration and delayed puberty in girls. *The New England journal of medicine* 348(16), 1527-36.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., and Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21(18), 7153-60.
- Shapiro, L. A., Upadhyaya, P., and Ribak, C. E. (2007). Spatiotemporal profile of dendritic outgrowth from newly born granule cells in the adult rat dentate gyrus. *Brain research* 1149, 30-7.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410(6826), 372-6.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., and Gould, E. (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12(5), 578-84.
- Sikov, M. R., and Mahlum, D. D. (1968). Cross-placental transfer of selected actinides in the rat. *Health physics* 14(3), 205-8.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., and Wojtowicz, J. M. (2005). A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130(4), 843-52.
- Sommer, L., Ma, Q., and Anderson, D. J. (1996). neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Molecular and cellular neurosciences* 8(4), 221-41.
- Souidi, M., Tissandie, E., Racine, R., Ben Soussan, H., Rouas, C., Grignard, E., Dublineau, I., Gourmelon, P., Lestaevel, P., and Gueguen, Y. (2009). [Uranium : properties and biological effects after internal contamination]. *Annales de biologie clinique* 67(1), 23-38.
- Squibb, K. S., Gaitens, J. M., Engelhardt, S., Centeno, J. A., Xu, H., Gray, P., and McDiarmid, M. A. (2012). Surveillance for long-term health effects associated with depleted uranium exposure and retained embedded fragments in US veterans. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 54(6), 724-32.
- Squibb, K. S., and McDiarmid, M. A. (2006). Depleted uranium exposure and health effects in Gulf War veterans. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361(1468), 639-48.
- Squire, L. R. (1992). Memory and the hippocampus : a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological review* 99(2), 195-231.
- Steriade, M. (2004). Slow-wave sleep : serotonin, neuronal plasticity, and seizures. *Archives italiennes de biologie* 142(4), 359-67.
- Steullet, P., Cabungcal, J. H., Kulak, A., Kraftsik, R., Chen, Y., Dalton, T. P., Cuenod, M., and Do, K. Q. (2010). Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus : impairment of parvalbumin neurons, gamma oscillations, and related behaviors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(7), 2547-58.
- Stern L, Peyrot R (1927). Le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique aux divers stades de développement chez les diverses espèces animales. *C R soc Bio (Paris)*. 96 :1124-1126.

- Stern L, Rapoport JL, Lokschina ES (1929). Le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique chez les nouveaux-nés. *C R Soc Biol (Paris)*. 100 :231-223.
- Stern L, Rapoport JL, (1928). Les rapports entre l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et les alterations de son substratum morphologique. *C R Soc Biol (Paris)* 98 :1515-1517.
- Storm, H. H., Jorgensen, H. O., Kejs, A. M., and Engholm, G. (2006). Depleted uranium and cancer in Danish Balkan veterans deployed 1992-2001. *Eur J Cancer* 42(14), 2355-8.
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M. E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104(3), 365-76.
- Sussulini, A., and Becker, J. S. (2015). Application of laser microdissection ICP-MS for high resolution elemental mapping in mouse brain tissue : a comparative study with laser ablation ICP-MS. *Talanta* 132, 579-82.
- Sutton, M and Burastero, SR. (2004). Uranium(VI) solubility and speciation in simulated elemental human biological fluids. *Chem Res Toxicol* 17(11) :1468-80.
- Sutula, T., Cascino, G., Cavazos, J., Parada, I., and Ramirez, L. (1989). Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Annals of neurology* 26(3), 321-30.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., and Caviness, V. S., Jr. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15(9), 6046-57.
- Talamini, L. M., Koch, T., Luiten, P. G., Koolhaas, J. M., and Korf, J. (1999). Interruptions of early cortical development affect limbic association areas and social behaviour in rats ; possible relevance for neurodevelopmental disorders. *Brain research* 847(1), 105-20.
- Tan, X., and Shi, S. H. (2013). Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2(4), 443-59.
- Tanapat, P, Galea, L. A., and Gould, E. (1998). Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 16(3-4), 235-9.
- Tarabykin, V, Stoykova, A., Usman, N., and Gruss, P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by *Svet1* gene expression. *Development* 128(11), 1983-93.
- Tashiro, A., Makino, H., and Gage, F. H. (2007). Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis : a critical period during an immature stage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(12), 3252-9.
- Taulan, M., Paquet, F, Maubert, C., Delissen, O., Demaille, J., and Romey, M. C. (2004). Renal toxicogenomic response to chronic uranyl nitrate insult in mice. *Environmental health perspectives* 112(16), 1628-35.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., and Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Exs* 101, 133-64.
- Thatcher, R. W., Lester, M. L., McAlaster, R., and Horst, R. (1982). Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive functioning in children. *Archives of environmental health* 37(3), 159-66.
- Tirmarche, M., Baysson, H., and Telle-Lamberton, M. (2004). [Uranium exposure and cancer risk : a review of epidemiological studies]. *Revue d'épidémiologie et de sante publique* 52(1), 81-90.
- Tissandie, E., Gueguen, Y., Lobaccaro, J. M., Paquet, F, Aigueperse, J., and Souidi, M. (2006). Effects of depleted uranium after short-term exposure on vitamin D metabolism in rat. *Archives of toxicology* 80(8), 473-80.

- Toni, N., and Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* 33(6), 1062-8.
- Toscano, C. D., and Guilarte, T. R. (2005). Lead neurotoxicity : from exposure to molecular effects. *Brain research. Brain research reviews* 49(3), 529-54.
- Tournier, B. B., Frelon, S., Tournalias, E., Agez, L., Delissen, O., Dublineau, I., Paquet, F., and Petitot, F. (2009). Role of the olfactory receptor neurons in the direct transport of inhaled uranium to the rat brain. *Toxicology letters* 190(1), 66-73.
- Ubios, A. M., Marzorati, M., and Cabrini, R. L. (1997). Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health physics* 72(5), 713-5.
- Ulloa, L., and Messmer, D. (2006). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein : friend and foe. *Cytokine & growth factor reviews* 17(3), 189-201.
- Vacquier, B., Rage, E., Leuraud, K., Caer-Lorho, S., Houot, J., Acker, A., and Laurier, D. (2011). The influence of multiple types of occupational exposure to radon, gamma rays and long-lived radionuclides on mortality risk in the French "post-55" sub-cohort of uranium miners : 1956-1999. *Radiation research* 176(6), 796-806.
- Vacquier, B., Rogel, A., Leuraud, K., Caer, S., Acker, A., and Laurier, D. (2009). Radon-associated lung cancer risk among French uranium miners : modifying factors of the exposure-risk relationship. *Radiation and environmental biophysics* 48(1), 1-9.
- Vaidya, V. A., Marek, G. J., Aghajanian, G. K., and Duman, R. S. (1997). 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(8), 2785-95.
- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., and Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23), 13427-31.
- 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(6875), 1030-4.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(38), 8680-5.
- Varghese, F. P., and Brown, E. S. (2001). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder : A Brief Primer for Primary Care Physicians. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry* 3(4), 151-155.
- Verina, T., Rohde, C. A., and Guilarte, T. R. (2007). Environmental lead exposure during early life alters granule cell neurogenesis and morphology in the hippocampus of young adult rats. *Neuroscience* 145(3), 1037-47.
- Verreet, T., Quintens, R., Van Dam, D., Verslegers, M., Tanori, M., Casciati, A., Neefs, M., Leysen, L., Michaux, A., Janssen, A., D'Agostino, E., Vande Velde, G., Baatout, S., Moons, L., Pazzaglia, S., Saran, A., Himmelreich, U., De Deyn, P. P., and Benotmane, M. A. (2015). A multidisciplinary approach unravels early and persistent effects of X-ray exposure at the onset of prenatal neurogenesis. *Journal of neurodevelopmental disorders* 7(1), 3.
- Virgintino, D., Maiorano, E., Errede, M., Vimercati, A., Greco, P., Selvaggi, L., Roncali, L., and Bertossi, M. (1998). Astroglia-microvessel relationship in the developing human telencephalon. *The International journal of developmental biology* 42(8), 1165-8.
- von Waechter, R., and Jaensch, B. (1972). Generation times of the matrix cells during embryonic brain development : an autoradiographic study in rats. *Brain research* 46, 235-50.
- Vorhees C and Williams M (2006). Morris water maze : procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* ; 1(2) : 848-858.

- Vukovic, J., Borlikova, G. G., Ruitenbergh, M. J., Robinson, G. J., Sullivan, R. K., Walker, T. L., and Bartlett, P. F. (2013). Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33(15), 6603-13.
- Wade-Gueye, N. M., Delissen, O., Gourmelon, P., Aigueperse, J., Dublineau, I., and Souidi, M. (2012). Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochimica et biophysica acta* 1820(7), 1121-7.
- Wang, S. L., Xu, X. R., Sun, Y. X., Liu, J. L., and Li, H. B. (2013). Heavy metal pollution in coastal areas of South China : a review. *Marine pollution bulletin* 76(1-2), 7-15.
- Wappelhorst, O., Kuhn, I., Heidenreich, H., and Markert, B. (2002). Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition* 18(4), 316-22.
- Warner-Schmidt, J. L., and Duman, R. S. (2006). Hippocampal neurogenesis : opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16(3), 239-49.
- Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., Lu, B., and Xu, B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(41), 14318-30.
- WHO (2006). Guidelines for drinking water Quality. First addendum to third edition. World Health Organisation doi.
- WHO (2011). Guidelines for drinking water Quality. First addendum to third edition. World Health Organisation doi.
- WHO (2012). Uranium in drinking water. World Health Organisation doi.
- Wrenn, M. E., Durbin, P. W., Howard, B., Lipsztein, J., Rundo, J., Still, E. T., and Willis, D. L. (1985). Metabolism of ingested U and Ra. *Health physics* 48(5), 601-33.
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F. J., and Santos, A. M. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks : difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus* 9(6), 668-81.
- Yang, Y., Ma, Y., Ni, L., Zhao, S., Li, L., Zhang, J., Fan, M., Liang, C., Cao, J., and Xu, L. (2003). Lead exposure through gestation-only caused long-term learning/memory deficits in young adult offspring. *Experimental neurology* 184(1), 489-95.
- Yokel, R. A. (2006). Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 10(2-3), 223-53.
- Zaire, R., Notter, M., Riedel, W., and Thiel, E. (1997). Unexpected rates of chromosomal instabilities and alterations of hormone levels in Namibian uranium miners. *Radiation research* 147(5), 579-84.
- Zamora, M. L., Tracy, B. L., Zielinski, J. M., Meyerhof, D. P., and Moss, M. A. (1998). Chronic ingestion of uranium in drinking water : a study of kidney bioeffects in humans. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 43(1), 68-77.
- Zappone, C. A., and Sloviter, R. S. (2001). Commissurally projecting inhibitory interneurons of the rat hippocampal dentate gyrus : a colocalization study of neuronal markers and the retrograde tracer Fluoro-gold. *The Journal of comparative neurology* 441(4), 324-44.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F. H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132(4), 645-60.
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Jr., Ming, G. L., and Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26(1), 3-11.

- Zhao, S., Chai, X., Forster, E., and Frotscher, M. (2004). Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development* 131(20), 5117-25.
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., and Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 163(5), 1064-78.
- Zhu, G., Tan, M., Li, Y., Xiang, X., Hu, H., and Zhao, S. (2009). Accumulation and distribution of uranium in rats after implantation with depleted uranium fragments. *Journal of radiation research* 50(3), 183-92.

Valorisations

Communications affichées

Meeting Doremi, janvier 2012, Institut Curie

Is neurogenesis altered after chronic internal contamination of uranium during brain development ?

Journées de l'école doctorale, juin 2013, Kremlin-Bicêtre

Une contamination interne chronique à l'uranium modifie t'elle le processus de la neurogenèse au cours du développement chez le rat ?

Journées des thèses IRSN, octobre 2013, Presqu'île de Giens

Une contamination interne chronique à l'uranium modifie t'elle le processus de la neurogenèse au cours du développement chez le rat ?

Annual meeting of the society of neurosciences, 15-19 novembre 2014, Washington

Is neurogenesis altered after chronic internal contamination of uranium during brain development ?

Congrès des neurosciences française, mai 2015, Montpellier

A possible link between behavior impairment and neurogenesis disturbances in adult rats exposed to uranium during development

Congrès Eurotox, septembre 2015, Porto

A possible link between behavior impairment and neurogenesis disturbances in adult rats exposed to uranium during development

Communications orales

Journées des thèses IRSN, mars 2014, Paris

Une contamination interne chronique à l'uranium modifie t'elle le processus de la neurogenèse au cours du développement chez le rat ?

Young researchers in life sciences, 26-28 mai 2014, Paris

Is neurogenesis altered after chronic internal contamination of uranium during brain development ?

Meeting Doremi, juillet 2014, Munich

Is neurogenesis altered after chronic internal contamination of uranium during brain development ?

Journées des thèses IRSN, mars 2015, Paris

Une contamination interne chronique à l'uranium appauvri modifie-t-elle le processus de neurogenèse au cours du développement cérébral et à l'âge adulte chez le rat ?

Titre : Rôle de la neurogenèse au cours du développement dans les troubles comportementaux induits par l'uranium

Mots clés : neurogenèse, uranium, développement, hippocampe, comportement

Résumé : Durant toute sa vie, l'Homme est continuellement exposé à des composés neurotoxiques présents dans l'environnement. Pendant son développement, le cerveau est plus sensible à ces composés et des perturbations dans son processus de formation peuvent avoir des répercussions persistantes à l'âge adulte. L'uranium (U) est un métal lourd présent dans l'environnement. Il induit des effets sur les fonctions cérébrales des animaux, ainsi que sur les propriétés neurochimiques. L'objectif de ma thèse était d'étudier si l'exposition à l'uranium appauvri (UA) dès le stade *in utero* pouvait impacter les processus de la neurogenèse, qui sont impliqués dans la formation du cerveau au cours du développement et dans la plasticité synaptique à l'âge adulte. Alors qu'une exposition à l'UA induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans le neuroépithélium hippocampique et une diminution de la mort cellulaire aux stades préna-

tals, l'UA cause des effets inverses dans le gyrus denté aux stades postnatals. De plus, l'UA induit une diminution de l'entrée des neurones vers la voie de différenciation neuronale dans l'hippocampe au cours du développement. À l'âge adulte, l'UA entraîne également une diminution de la différenciation neuronale, mais n'a pas d'impact sur la prolifération cellulaire. Enfin, l'UA induit une augmentation de l'état dépressif des animaux aux stades postnatal tardif et à l'âge adulte, ainsi qu'une diminution de la mémoire spatiale à l'âge adulte. Par conséquent, une exposition à l'UA au cours du développement cérébral cause des modifications dans les processus de neurogenèse associées à des troubles cognitifs et émotionnels à l'âge adulte. L'U peut donc présenter un risque pour la santé humaine et plus particulièrement chez les femmes enceintes et les enfants.

Title : Implication of neurogenesis during brain development in behavior disorders caused by depleted uranium

Keywords : neurogenesis, uranium, development, hippocampus, behavior

Abstract : Humans are continuously exposed to neurotoxic compounds in the environment. The developing brain is more susceptible to neurotoxic compounds and modifications in its growth could lead to disorders in adulthood. Uranium (U) is an environmental heavy metal and induces behavioral disorders as well as affects neurochemistry. The aim of my thesis was to investigate whether depleted uranium (DU) exposure affects neurogenesis processes, which are implicated in brain development and in synaptic plasticity in adults. While DU increased cell proliferation in the hippocampal neuroepithelium and decreased cell death at prenatal stages, DU lead to opposite

effects in the dentate gyrus at postnatal stages. Moreover, DU had an inhibitory effect on the transition toward neuronal differentiation pathway during development. At adult stage, DU induced a decrease in neuronal differentiation but has no impact in cell proliferation. Finally, DU exposure during brain development caused depressive like behavior at late postnatal and adult stage, and decreased spatial memory at adult stage. Consequently, DU exposure during brain development caused modification in neurogenesis processes associated to cognitive and emotional disorders at adult age. U could present a threat to human health, especially in pregnant women and children.