



UNIVERSITE DE LIEGE

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée au

Département des Sciences et Gestion de l'Environnement

pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences

par

JEAN-BAPTISTE BRAQUENIER.

Titre :

*Etude de la toxicité développementale d'insecticides
organophosphorés :
Analyse comportementale de la souris CD1*

Année 2009

Jury :

Président : Pr. J-P. THOME

Membres : Dr. Y. LAMBERTY (UCB PHARMA)

Pr. J-C. PLUMIER

Pr. E. QUERTEMONT

Pr. P. SAGLIO (INRA RENNES)

Pr. E. TIRELLI

Dr. M. YLIEFF

RÉSUMÉ

Le chlorpyrifos (CPF) est un insecticide organophosphoré qui est capable de produire des effets développementaux chez les rongeurs, tels que des perturbations de la mémoire spatiale, des altérations du niveau de l'activité, des modifications du niveau d'anxiété et de la dépression. Cependant, ces troubles comportementaux persistants ont été décrits à partir de différentes périodes d'exposition courtes (4 jours), et à des doses juste sous le seuil de toxicité de ce produit, et ne peuvent donc pas renseigner directement sur le type de perturbations comportementales que pourrait produire une exposition à des doses plus basses de CPF administrées durant une plus grande partie du développement du cerveau.

Pour répondre à cette question, nous avons exposé des souris CD1 au CPF (*in utero* et via le lait ; par l'intermédiaire du gavage de la mère ; 5 mg/kg) durant la fin de la gestation et pendant les deux semaines postnatales. Ensuite, des tests comportementaux ont été réalisés avec les animaux adultes. Nous avons également étudié dans les mêmes conditions la phosalone (PHO), un insecticide organophosphoré dont la toxicité est similaire à celle du CPF, mais qui, contrairement à celui-ci, n'a pas encore donné lieu à des études de toxicité développementale. Nous avons déterminé que le CPF et la PHO sont capables de produire une altération de la mémoire spatiale à long terme (dans un labyrinthe de Lashley), avec un effet plus marqué chez les souris femelles que chez les mâles et pour la PHO. Par contre, seul le CPF altère la mémoire spatiale à court terme des souris mâles (test d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T). Le CPF et la PHO produisent également une augmentation du niveau d'anxiété (« *elevated plus maze* » et « *light and dark box* ») et donnent des signes de dépression (« *forced swimming test* ») chez les souris femelles uniquement. Par contre, le CPF et la PHO diminuent l'activité locomotrice spontanée (test d'actométrie et vidéotracking) des souris mâles et non des souris femelles.

Nous avons ensuite approfondi l'étude de l'anxiété développementale produite dans les mêmes conditions expérimentales mais par différentes doses subtoxiques. Cela nous a permis de préciser qu'une dose de CPF plus faible, soit 1 mg/kg, produisait une augmentation du niveau d'anxiété plus importante que 5 mg/kg chez la souris femelle.

Nous nous sommes intéressés ensuite à une exposition au CPF directement chez le jeune, afin de déterminer les troubles de l'anxiété conséquents à quatre périodes néonatales différentes de 4 jours. Dans ce contexte, 1 mg/kg de CPF durant 4 jours d'exposition par voie sous-cutanée suffirait à produire une augmentation du niveau d'anxiété chez les souris femelles, sauf pour une période d'exposition située en fin de la seconde semaine après la naissance.

La dose et la période d'exposition jouent donc un rôle sur le type d'effet produit. Ces expériences confirment également que plusieurs mécanismes d'altération du développement sont mis en route par le CPF.

Toujours dans le cadre de l'anxiété développée chez les souris femelles adultes et liée à une exposition périnatale au CPF en doses subtoxiques (1 mg/kg, via gavage de la mère), l'utilisation d'anxiolytiques spécifiques a révélé que les troubles de l'anxiété seraient en relation avec une modification du fonctionnement des récepteurs sérotoninergique 5HT_{1A}.

Une des implications de ces résultats est que l'exposition au CPF durant le développement du cerveau serait susceptible de produire des troubles comportementaux persistants apparaissant chez l'adulte, à partir de doses bien inférieures à celles décrites jusqu'ici dans la littérature. Il en va de même pour la PHO qui pourtant n'était pas encore renseignée comme représentant un danger pour le développement du cerveau des mammifères.

ABSTRACT

Perinatal exposure to apparently subtoxic doses of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos (CPF) elicits some form of developmental effects in adult rodents, like alteration of spatial memory, locomotor activity, anxiety and depression disorders. However, these persistent neurobehavioral effects are described in adults exposed during 4 days of perinatal treatment with doses close to the toxicity threshold, and do not indicate the consequences of a prolonged perinatal exposure to lower doses of CPF.

Therefore, we orally treated CD1 pregnant and lactating mice with subtoxic doses of CPF (5 mg/kg, daily) during the 4 last days of gestation and the following 2 weeks after delivery and assessed the behaviour of adult offspring. We also studied the phosalone (PHO), another organophosphorus insecticide, which has the same toxicity as CPF but whose developmental toxicity in mammals has not been examined yet. We have found that CPF and PHO produced an alteration of long-term spatial memory (in the Lashley maze). This effect was more pronounced in female mice and in PHO-treated mice. On the other hand, only CPF (and not PHO) produced a decrease in short-term spatial memory of male mice (spontaneous alternation in a transparent T-maze). Both insecticides increased the anxiety level (in the elevated plus maze and in the light and dark box) and induced signs of depression disorder (forced swimming test) in female mice. We showed that CPF and PHO also decreased the level of locomotor activity only in male mice.

Then we further studied the anxiety disorder developed by CPF using several different subtoxic doses of CPF. 1 mg/kg CPF daily treated female mice showed greater increase of anxiety level compared to 5 mg/kg.

To determine the developmental effects of short exposure to low subtoxic CPF doses on anxiety levels, we directly (subcutaneously) administrated 1 mg/kg (daily) during 4 different postnatal periods of 4 days to CD1 offspring and evaluated their anxiety level once adults. Exposed female mice presented a general increase of anxiety level except when administration occurred during the end of the second postnatal week.

The level and the time of the subtoxic exposure to CPF would influence anxiety. We concluded that CPF induced several mechanisms of developmental toxicity.

We used specific anxiolytic drugs to show that 5HT_{1A} serotonergic receptors are one of the mechanisms altered by a long perinatal period of subtoxic CPF exposure that produces an increase of anxiety level in adult female mice.

These results imply that exposure to CPF during brain development may represent a risk to produce persistent behavioural troubles, even at doses lower than previously described in the literature. Exposure to PHO for which no developmental effect has been described in mammals, may produce similar behavioural troubles.

Tous mes remerciements

à Monsieur Plumier
pour avoir supervisé ce travail
et m'avoir encouragé jusqu'au bout de la réalisation de cette Thèse ;

à Monsieur Thomé,
pour m'avoir permis de terminer la rédaction de cette Thèse dans de bonnes conditions,
ainsi que pour son aide lors de la rédaction ;

à Monsieur Quertemont,
pour sa disponibilité et ses judicieux conseils ;

à Monsieur Tirelli,
tant pour les bons conseils qu'il m'a prodigué
que pour avoir mis à ma disposition le matériel expérimental ;

à Monsieur Ylieff pour ses bons conseils lors de la rédaction ;

à Vincent Didone,
à la fois pour tous ces conseils avisés et son aide performante;

à Sandrine Seyen,
pour l'efficacité de son travail et sa bonne humeur ;

à Marie Baland
qui a collaboré à une partie de la réalisation expérimentale (CH2);

à Philippe Marc et collègues,
pour le matériel mis à ma disposition dans la phase initiale du projet.

Un tout grand merci à ma chaleureuse petite famille,
qui a été si compréhensive durant la rédaction de la Thèse.

AVANT-PROPOS.

Notre travail s'inscrit dans l'étude de la toxicité développementale que peuvent produire les insecticides organophosphorés chez les mammifères, à partir d'un niveau d'exposition chronique réputé ne pas produire d'effets neurotoxiques directs.

Bien que des études cliniques et épidémiologiques ont permis de mettre en évidence des formes de toxicité développementale chez l'Homme, ces études sont limitées. En l'occurrence, elles sont particulièrement longues à réaliser au vu de la longue durée du développement nerveux de l'Homme. Des années sont donc nécessaires avant d'en tirer des conclusions. Une autre limite que présentent ces expériences épidémiologiques est que des facteurs sociaux et environnementaux sont susceptibles de produire des biais expérimentaux (par exemple, la présence dans le milieu d'autres substances chimiques susceptibles de produire également des effets développementaux). En conséquence, il est nécessaire d'utiliser en parallèle des modèles animaux *in vivo* et des modèles *in vitro*, à la fois pour déterminer la toxicité développementale du produit et d'en comprendre les mécanismes, car ces modèles présentent l'avantage de fournir plus rapidement des résultats, mais aussi de mieux contrôler les conditions environnementales que dans les recherches épidémiologiques.

L'étude de toxicité développementale d'insecticides organophosphorés que nous avons réalisée, utilise le modèle animal souris (CD1) et mesure les troubles comportementaux persistants chez l'adulte, produits par une exposition chronique subtoxique durant la période périnatale.

Nous avons présenté cette étude expérimentale en quatre parties. Dans la première partie (chapitre 2) nous nous sommes intéressés aux effets neurocomportementaux développés par une exposition subtoxique au chlorpyrifos durant une grande partie du développement du cerveau. Nous avons choisi d'utiliser une batterie de tests neurocomportementaux réalisés chez la souris adulte. Nous avons également étudié la neurotoxicité développementale d'un autre insecticide organophosphoré : la phosalone. En effet, cette molécule qui possède le même mécanisme de toxicité que le CPF et dont les capacités insecticides sont également très similaires à celles du CPF, n'a pas encore été répertoriée comme produisant de la toxicité développementale chez l'Homme ou chez les rongeurs.

Dans les chapitres 3 et 4, figurent respectivement les études de l'importance de la dose et de la période d'exposition au CPF dans l'occurrence des effets développementaux concernant une modification persistante du niveau d'anxiété chez la souris.

Le chapitre 3 est présenté sous forme d'un article (en anglais) proposé dans *Neurotoxicology and Teratology* (Braquenier *et al.*, 2009)

Dans la dernière partie (chapitre 5) se trouve une étude de l'implication d'un type de récepteur sérotoninergique (5HT_{1A}) dans l'anxiété développementale lié à l'exposition subtoxique au CPF.

Classiquement une introduction générale (chapitre 1) permettra de rassembler les informations nécessaires à la compréhension des expériences, et une discussion générale (Chapitre 6) permettra de faire le point sur les résultats obtenus et les implications de ceux-ci.

LISTE DES ABRÉVIATIONS.

5HT :	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5HT _{1A} (R) :	(récepteur) sérotoninergique de type 1A
5HT ₂ (R):	(récepteur) sérotoninergique de type 2
AC :	adénylcyclase
ACh :	acétylcholine
AChE :	acétylcholinestérase
BuChE :	butyrylcholinestérase
CPF :	chlorpyrifos
CPO :	chlorpyrifos-oxon
CREB :	<i>cAMP response element binding protein</i>
DMSO :	<i>dimethyl sulfoxide</i> ou diméthylsulfoxy de
EPM :	« <i>elevated plus maze</i> » ou labyrinthe en croix surélevé
ESM :	erreur standard sur la moyenne
GABA :	(l') acide γ -aminobutyrique
GD n :	n ^{ème} jour de gestation
HD :	<i>head-dipping</i>
i.p. :	intra-péritonéale (piqûre intra-péritonéale)
LEC :	cortex entorhinal latéral
MEC :	cortex entorhinal médial
NCSFO:	nombre de croisements successifs de faisceaux (infrarouges) opposés
LI:	index d'apprentissage (<i>learning index</i>)
MBR :	récepteur mitochondrial aux benzodiazépines
OP :	insecticides organophosphorés
PCB :	biphényles polychlorés
PHO :	phosalone
PND n :	n ^{ème} jour postnatal
PKA:	protéine kinase A
PKC:	protéine kinase C
p.o. :	<i>per os</i>
PON1 :	paraoxonase 1
s.c. :	sous-cutané(e) (piqûre sous-cutanée)

SNC : système nerveux central

TCP : trichloro-pyridinol

TABLE DES MATIÈRES

RESUMÉ	I
REMERCIEMENTS.	III
AVANT-PROPOS.	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.	VI
TABLE DES MATIÈRES.....	VIII
1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.	- 1 -
1.1 L'ENJEU DE L'ÉTUDE DES INSECTICIDES.	- 1 -
1.2 LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 2 -
1.2.1 NATURE CHIMIQUE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 3 -
1.2.2 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 4 -
1.2.3 MÉCANISME D'ACTION DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 8 -
1.2.4 ÉVOLUTION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE AU COURS DE LA VIE.	- 9 -
1.2.5 L'INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE PAR LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 10 -
1.2.6 MÉTABOLISME DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS ET DU CHLORPYRIFOS.	- 10 -
1.2.7 TOXICITÉ AIGÛE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS CHEZ LES INSECTES.	- 13 -
1.3 NEUROTOXICITÉ AIGÛE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 13 -
1.3.1 NEUROTOXICITÉ	- 13 -
1.3.2 FORMES ET CAUSES DE NEUROTOXICITÉ PRODUITES PAR LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 14 -
1.4 NEUROTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS	- 15 -
1.4.1 LA NEUROTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE.	- 15 -
1.4.1.1 Les perturbateurs du développement du cerveau	- 15 -
1.4.1.2 Sensibilité particulière du cerveau en développement.	- 16 -
1.4.1.3 Développement du cerveau et période de sensibilité à la toxicité développementale chez les mammifères	- 17 -
1.4.1.4 Possibilités d'exposition de l'Homme aux insecticides durant le développement du cerveau.	- 18 -
1.4.1.5 Les effets développementaux retardés	- 18 -
1.4.2 LE DÉVELOPPEMENT DU SNC ET LES INTERFÉRENCES POSSIBLES AVEC LES SUBSTANCES NEUROTOXIQUES.	- 19 -
1.4.2.1 Formations anatomiques.	- 19 -
1.4.2.2 Principales fonctions des différentes grandes structures du cerveau.	- 21 -
1.4.2.3 Formations cellulaires et tissulaires	- 22 -
1.4.3 ÉTUDE DE LA NEUROTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.	- 34 -
1.4.3.1 Etudes épidémiologiques et effets neurocomportementaux chez l'Homme.	- 34 -
1.4.3.2 Modèles animaux et mécanismes impliqués dans la toxicité développementale des insecticides organophosphorés (CPF)	- 37 -
1.4.3.3 Les études neurocomportementales	- 43 -
1.5 OBJECTIFS DE LA THÈSE.	- 50 -

2	« TOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DU CHLORPYRIFOS ET DE LA PHOSALONE EN DOSES CHRONIQUES SUBTOXIQUES : ANALYSE COMPORTEMENTALE CHEZ LA SOURIS CD1 ».....	- 52 -
2.1	INTRODUCTION.....	- 52 -
2.2	OBJECTIFS.....	- 54 -
2.3	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	- 54 -
2.3.1	PRODUITS.....	- 54 -
2.3.2	ANIMAUX ET TRAITEMENTS.....	- 54 -
2.3.3	MESURES COMPORTEMENTALES.....	- 56 -
2.3.3.1	Activité locomotrice spontanée.....	- 56 -
2.3.3.2	Mémoire et apprentissage.....	- 59 -
2.3.3.3	Anxiété et dépression.....	- 66 -
2.4	RÉSULTATS.....	- 71 -
2.4.1	MESURE DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE.....	- 71 -
2.4.1.1	Mesure de l'activité locomotrice dans le test d'actométrie (60 min).....	- 71 -
2.4.1.2	Mesure de l'activité locomotrice spontanée par le traceur vidéo (mâles).....	- 75 -
2.4.2	MÉMOIRE ET APPRENTISSAGE.....	- 80 -
2.4.2.1	Etude de la mémoire et de l'apprentissage dans le labyrinthe de Lashley III.....	- 80 -
2.4.2.2	Etude de la mémoire dans le labyrinthe en T: alternance spontanée.....	- 89 -
2.4.3	ANXIÉTÉ ET DÉPRESSION.....	- 90 -
2.4.3.1	Mesure de l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé.....	- 90 -
2.4.3.2	Mesure de l'anxiété dans le « <i>Light/dark box test</i> ».....	- 93 -
2.4.3.3	Mesure du niveau de dépression dans le test de nage forcée.....	- 96 -
2.5	DISCUSSION.....	- 98 -
2.5.1	EFFETS SUR LE NIVEAU D'ACTIVITÉ.....	- 98 -
2.5.2	EFFETS COGNITIFS (mémoire et apprentissage).....	- 98 -
2.5.3	EFFETS SUR LE NIVEAU D'ANXIÉTÉ.....	- 99 -
2.5.4	COMPARAISON DES EFFETS COMPORTEMENTAUX OBTENUS AVEC CEUX DÉCRITS DANS LA LITTÉRATURE.....	- 99 -
3	“ <i>ANXIETY IN ADULT FEMALE MICE FOLLOWING PERINATAL EXPOSURE TO SUBTOXIC DOSES OF CHLORPYRIFOS</i> ”.....	- 106 -
	INTRODUCTION.....	- 106 -
	ARTICLE (Braquenier <i>et al.</i> , 2009).....	- 106 -
	CONCLUSION.....	- 126 -
4	« RECHERCHE DE LA PÉRIODE SENSIBLE POUR L'ANXIÉTÉ DÉVELOPPEMENTALE PERSISTANTE LIÉE À L'EXPOSITION POSTNATALE AU CHLORPYRIFOS EN DOSES SUBTOXIQUES ».....	- 127 -
4.1	INTRODUCTION.....	- 127 -
4.2	OBJECTIFS.....	- 129 -
4.3	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	- 130 -
4.3.1	ANIMAUX.....	- 130 -
4.3.2	PRODUITS.....	- 130 -
4.3.3	TESTS COMPORTEMENTAUX.....	- 131 -
	Test d'actométrie.....	- 131 -
	Le “ <i>light/dark box test</i> ”.....	- 131 -
4.4	RÉSULTATS.....	- 132 -
4.4.1	POIDS.....	- 132 -
4.4.2	MESURE DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE DANS LE TEST D'ACTOMÉTRIE.....	- 135 -
4.4.3	MESURE DU NIVEAU D'ANXIÉTÉ DANS LE TEST « <i>LIGHT/DARK BOX</i> ».....	- 138 -
4.5	DISCUSSION.....	- 142 -

5	« ÉTUDE DE L'IMPLICATION DU SYSTÈME SÉROTONINERGIQUE DANS L'ANXIÉTÉ DÉVELOPPEMENTALE AU CPF : RÉCEPTEURS 5HT _{1A} »	- 145 -
5.1	INTRODUCTION.....	- 145 -
5.2	OBJECTIFS	- 149 -
5.3	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	- 150 -
5.3.1	SUBSTANCES ET DROGUES.....	- 150 -
5.3.2	ANIMAUX ET TRAITEMENTS.....	- 150 -
5.3.3	LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ	- 151 -
5.3.4	TEST D'ACTOMÉTRIE.....	- 151 -
5.4	RÉSULTATS.....	- 152 -
5.4.1	POIDS DES ANIMAUX.....	- 152 -
5.4.2	ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES FEMELLES.....	- 152 -
5.4.3	MESURE DU NIVEAU D'ANXIÉTÉ DANS LE LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ.....	- 152 -
	Le % du temps passé dans les bras ouverts.....	- 152 -
	Le % du nombre d'entrées dans les bras ouverts.....	- 153 -
5.5	DISCUSSION.....	- 155 -
6	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	- 159 -
6.1	EFFETS DÉVELOPPEMENTAUX DU CHLORPYRIFOS ET DE LA PHOSALONE.....	- 159 -
6.1.1	ALTÉRATION DE LA MÉMOIRE.....	- 159 -
6.1.2	ALTÉRATION DU NIVEAU D'ANXIÉTÉ.....	- 168 -
6.1.3	TROUBLES DE LA DÉPRESSION.....	- 173 -
6.1.4	TROUBLES DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE.....	- 174 -
6.2	IMPLICATIONS CHEZ L'HOMME : ÉTABLISSEMENT DU NIVEAU D'EXPOSITION DE SUBTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE.....	- 175 -
6.3	CONCLUSION.....	- 177 -
7	PERSPECTIVES.....	- 180 -
8	BIBLIOGRAPHIE.....	- 181 -

CHAPITRE 1 :
INTRODUCTION GÉNÉRALE

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.

1.1 L'ENJEU DE L'ÉTUDE DES INSECTICIDES.

L'utilisation massive des insecticides* synthétiques, et en particulier de ceux appartenant à la famille des organochlorés, constitua entre 1945 et 1960, un énorme progrès pour l'agriculture et a permis d'assurer une production alimentaire suffisante pour une population en grande croissance. Ceci, tant et si bien que l'utilisation massive des insecticides est devenue une technique quasiment indispensable à la plupart des pratiques agricoles quel que soit le niveau de développement du pays. Leur utilisation a également contribué à l'amélioration de la santé publique en luttant contre certains insectes vecteurs de maladies (Ramade, 2005).

Cependant, avec l'utilisation massive des premiers insecticides synthétiques (particulièrement les insecticides organochlorés) sont apparus des signes évidents de toxicité et d'effets néfastes pour l'environnement et pour l'Homme (Eriksson *et al.*, 1990; Eriksson *et al.*, 1992; Snedeker, 2001; Den Hond and Schoeters, 2006; Schoeters and Hoogenboom, 2006; Bonde *et al.*, 2008). Afin de faire face à ces problèmes, mais également à l'apparition de souches résistantes chez les insectes, les industries chimiques ont développé d'autres familles d'insecticides dont le principe actif est différent, quoiqu'il s'agisse toujours de neurotoxiques. Ces familles sont les carbamates, les pyréthroïdes, les nicoténoïdes et les organophosphorés. Beaucoup des molécules proposées successivement dans chacune des familles se sont révélées également toxiques ou capables de produire des effets néfastes soit pour l'environnement, soit pour l'Homme, ce qui a mené de nouveau à la production d'autres variantes. De cette manière, production de nouveaux insecticides et études de toxicité se sont livrés une course effrénée, dans laquelle les industries ont gardé une bonne avance. Pour faire face à ce problème, le Parlement Européen a instauré récemment le projet REACH (*Registration, evaluation and authorization of chemicals*) dans lequel les industriels doivent et devront faire la preuve scientifique de la non-toxicité de leurs substances en fonction de normes officielles. Cependant, les études de toxicité de ces insecticides se limitent souvent aux diverses formes de toxicité directe et aiguë des insecticides. Pourtant, une autre forme de toxicité existe. En effet, certains des effets nocifs produits par des insecticides neurotoxiques sont liés à une

* Produit utilisé pour détruire les insectes nuisibles.

perturbation du développement du système nerveux. En particulier, il est apparu qu'une partie de la population humaine (les embryons, fœtus et enfants) est plus particulièrement sensible à toute une série de substances chimiques présentes dans l'environnement même en concentration très faible dite « concentration environnementale ». Cette autre forme de toxicité sur l'organisme en développement se nomme neurotoxicité développementale et s'avère donc liée à une « exposition environnementale » dans laquelle certains insecticides, dont les organophosphorés jouent un rôle (Costa *et al.*, 2004; Colborn, 2006; Grandjean and Landrigan, 2006; Bjorling-Poulsen *et al.*, 2008).

La toxicité développementale n'est pas un phénomène anecdotique. Il a été estimé que 12 millions d'enfants, rien qu'aux Etats-Unis, souffrent de troubles de l'apprentissage, d'altérations neurodéveloppementales et comportementales liées à une exposition environnementale à différents produits chimiques dont certains insecticides. Le coût de ces problèmes s'élèverait à 50 milliards de dollars (Costa *et al.*, 2004).

L'étude de la toxicité développementale des insecticides, comme celles des organophosphorés serait donc d'un grand intérêt, tant pour la santé publique que pour aider à évaluer le réel rendement économique de ces substances.

Nous nous intéresserons au cas particuliers de la toxicité développementale des insecticides organophosphorés (OP).

1.2 LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

Les capacités neurotoxiques de ces substances furent découvertes d'abord chez l'Homme par le Dr. Schrader, quelques années avant la guerre 40-45, lors de l'élaboration de gaz de combat neurotoxiques comme le sarin, le soman et le tabun (Sidell, 1974; Balali-Mood and Balali-Mood, 2008). Ce n'est que quelques années plus tard que leur action insecticide fut mise en évidence. Dès lors, de nombreux OP ont été synthétisés (Kwong, 2002). Leurs propriétés physico-chimiques ont été modifiées afin d'améliorer leur activité insecticide mais également de manière à réduire leur stabilité dans l'environnement (Lotti, 2002). Leur forte capacité insecticide associée à une toxicité aigüe considérée modérée chez les mammifères et une stabilité relativement faible dans l'environnement (par rapport aux organochlorés) ont fait des OP la principale classe d'insecticides utilisés dans le monde, et encore actuellement (Costa, 2006; Costa *et al.*, 2008).

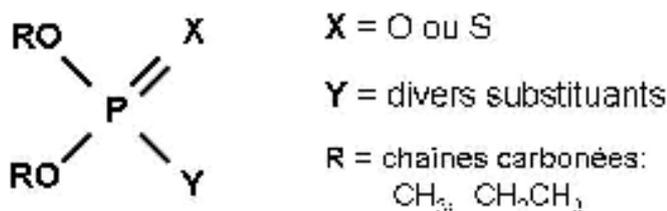
Leur principe actif repose sur la perturbation du fonctionnement du système nerveux par l'inhibition d'une enzyme essentielle à son bon fonctionnement : l'acétylcholinestérase

(AChE). Cette enzyme est commune à de nombreux représentants du règne animal, ce qui ne confère aux OP qu'une relative sélectivité. C'est la raison pour laquelle leur activité ne se limite pas aux insectes. Par exemple, les OP sont très dangereux pour les écosystèmes aquatiques (invertébrés et poissons), même à de très faibles doses. Dans notre étude, nous ne nous intéresserons pas à ce phénomène mais aux effets toxiques que peuvent produire les OP chez les mammifères.

1.2.1 NATURE CHIMIQUE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

Tous les OP ont la même structure de base. Il s'agit d'ester d'alcools avec l'acide orthophosphorique ou avec l'acide thiophosphorique.

On peut schématiser leur structure chimique comme ci-dessous :



Lorsque la double liaison avec le phosphore se fait avec un soufre, on parle d'organothiophosphates.

Le groupe R est en général un groupe éthyle ou méthyle.

On peut subdiviser les OP en trois groupes, en fonction du type de substituant en Y (nommé en anglais « leaving group ») (Costa, 2006): les OP aliphatiques (par exemple : *dichlorvos*, *malathion*, *acéphate*, *déméton*, *dicrotophos*, *diméthoate*, *éthion*, *formothion*, *mévinphos*, *monocrotophos*, *naled*, *ométhoate*, *phorate*, *phosphamidon*, *trichlorfon*), les OP à cycle phényle (Par exemple : *phosalone*, *parathion*, *éthyl parathion*, *méthyl parathion*, *bromophos*, *chlorfenvinphos*, *fénitrothion*, *fenthion*, *fonofos*, *isofenphos*, *profénofos*, *protiophos*) et les OP à hétérocycle (dont : *chlorpyrifos*, *diazinon*, *étrimfos*, *isoxation*, *quinalphos*, *méthidation*, *phosmet*)

1.2.2 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

Nous avons choisi de décrire les propriétés physico-chimiques et quelques propriétés de toxicité aigüe des deux OP que nous allons étudier : le chlorpyrifos (CPF) et la phosalone (PHO).

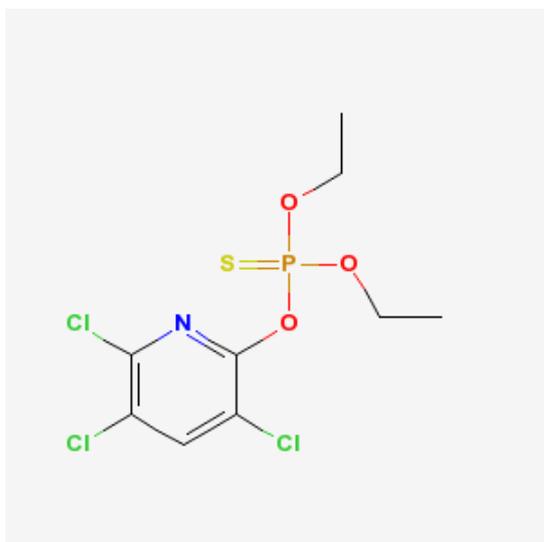
Le chlorpyrifos[†] :

Utilisation : le CPF est un insecticide organophosphoré à large spectre. Il est utilisé aussi bien pour tuer des moustiques que des cancrelats, des larves de scarabées, des puces, des mouches, des termites, des fourmis et des poux. Il est utilisé comme insecticide sur les graines, le coton, les fruits, les noix dans les champs et vergers, mais aussi sur des pelouses et plantes ornementales. Il est aussi répertorié comme antiparasitaire en utilisation directe sur le mouton et des dindes, mais aussi en utilisation indirecte, pour le traitement de site de cheval, des niches de chien, des logements domestiques, des bâtiments agricoles, des poubelles de stockage et des établissements commerciaux.

Nom pour l'utilisation professionnelle : Dursban

(mais aussi Empire, Eradex, Lorsban, Pageant, Piridane, Scout, et Stipend).

Structure chimique[‡] :



Formule moléculaire brute : C₉H₁₁Cl₃NO₃PS

[†] Références : EXTTOXNET (Extension Toxicology Network ; Pesticide Information Profiles)

<http://exttoxnet.orst.edu/pips/chlorpyr.htm>

[‡] Références : pubChem compound data base

Nom chimique : (IUPAC) O,O-diéthyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate

Propriétés physiques :

Masse moléculaire : 350,59.

Solubilité dans l'eau : 0,002 g/l à 20 °C.

Point de fusion : 41,5 °C.

La pression de vapeur du CPF est de $2,49 \times 10^{-3}$ Pa à 25°C.

Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau : 4,82 à 5,11 (Élevé).

Persistence : le CPF est fortement absorbé par le sol et sa persistance dans le sol va de deux semaines à un an en fonction du type de sol, de son pH et du climat (Wauchope *et al.*, 1992). La vitesse d'hydrolyse du CPF dans l'eau augmente en fonction du pH et de la température ainsi qu'en présence de cuivre. Le temps de demi-vie dans l'eau à 25°C est de 35 à 48 jours (Howard *et al.*, 1991).

Limite de toxicité chez les animaux : chez les mammifères, la toxicité aiguë est considérée comme modérée. En effet, chez les rongeurs, en fonction des sources, la LD50 (dose létale pour 50 % des individus) par voie orale chez le rat va de 82 à 270 mg/kg et de 60 mg/kg chez la souris[§]. Chez les mammifères plus grands, la toxicité est plus modérée encore : chez le lapin, LD50= 1000 mg/kg et chez le mouton 800 mg/kg (Gallow and Lawryk, 1991 ; Kidd and James, 1991).

Le CPF paraît aussi toxique chez les oiseaux de grande taille que chez les petits mammifères : LD50 orale chez le canard 76 mg/kg, mais très toxique chez les oiseaux de petite taille : LD50 oral chez le pigeon : 10 mg/kg (Kidd and James, 1991 ; U.S. Environmental Protection Agency. Registration Standard, 1989).

Par contre, la toxicité chez les organismes aquatiques est très élevée, tant chez les poissons que chez les invertébrés. Par exemple, après 48 heures d'exposition, la toxicité (LC50 ; concentration létale pour 50% des individus) survient à des doses inférieures à 1µg/L (après 48 heures) pour les Daphnies (*Daphnia magna*) et la LC50 est de 0,009 mg/L (après 96 heures) pour la truite arc-en-ciel.

[§] Référence : Extoxnet.

Une accumulation du produit a été constatée dans les sédiments de rivières et dans les tissus des organismes aquatiques (Racke, 1991 ; Schimmel, 1983).

La dose orale minimum à l'obtention d'une inhibition de l'AChE du cerveau : Cette dose a été établie aux alentours de 3 mg/kg.jour chez le rat, mais cette valeur varie en fonction des auteurs, du nombre de jours d'exposition, et du sexe des animaux. Les symptômes cholinergiques ne surviennent qu'au dessus de 5 mg/kg.jour par voie orale chez les rats (McCollister *et al.*, 1974).

La limite de la dose journalière acceptable (ADI) : 0,01 mg/kg (Lu, 1995)

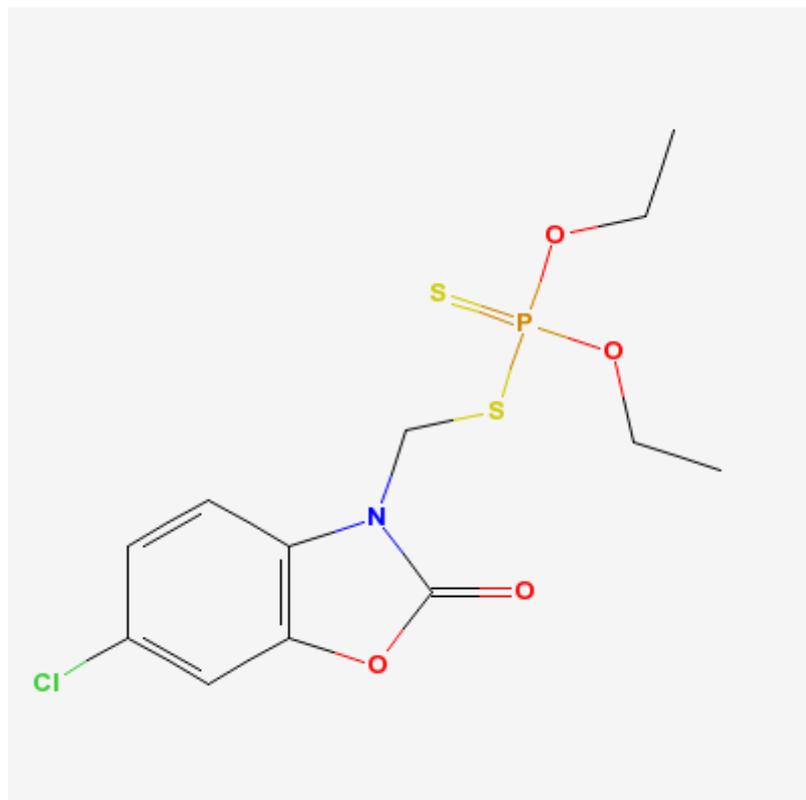
La phosalone**.

Utilisation : la PHO est un insecticide et acaricide non systémique, à large spectre, utilisé sur les arbres à fruits décidus, sur les légumes du jardin, sur le coton, les pommes de terre (Gallo. and Lawryk, 1991). Son activité insecticide peut durer 12 à 20 jours (Thomson, 1992).

Nom pour utilisation professionnelle : Azonfene, Benzofos, Rubitox, Zolone and RP 11974

Formule moléculaire brute : C₁₂H₁₅ClNO₄PS₂

Formule chimique†† :



Noms chimiques : S-6-chloro-2, 3-dihydro-2-oxobenzoxazol- 3-ylmethyl O

Propriétés physiques :

Masse moléculaire : 367,82

Solubilité dans l'eau : 10 mg/l à température ambiante

Point de fusion : 45-48°C

La pression de vapeur : négligeable à température ambiante

** Références : EXTTOXNET (Extension Toxicology Network ; Pesticide Information Profiles), (<http://extoxnet.orst.edu/pips/phosalon.htm>)

†† Référence : PubChem Compounds data base.

Logarithme de son coefficient de partage octanol-eau : 3,77 – 4,38 (élevé).

Persistence :

Dans l'eau, la PHO est stable à pH 7 et a une demi-vie de 9 jours à un pH de 9. La PHO se dégrade rapidement dans le sol (1-7 jours). La dissipation complète du produit des feuilles d'arbres fruitiers peut durer 1 à 9 semaines.

Limite de toxicité chez les animaux : chez les mammifères, la toxicité aiguë est modérée. La LD50 de la PHO par voie orale se trouve entre 82 et 205 mg/kg chez les rats mâles et entre 90 et 170 mg/kg pour les rats femelles. Elle est comprise entre 73 et 205 mg/kg chez la souris et a été établie à 2000 mg/kg chez les lapins. Chez les rats, en exposition chronique par voie orale, 2,4 mg/kg.jour est répertorié comme le niveau le plus bas sans effet sur l'activité de l'AChE plasmatique et 7,5 mg/kg.jour durant 1 mois paraît ne pas donner d'effet systémique observable. La toxicité est très forte pour les organismes aquatiques. Par exemple, la LC50 pour la truite arc-en-ciel est de 0.3 à 0.63 mg/l

ADI: 0.006 mg/kg.bw.

1.2.3 MÉCANISME D'ACTION DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

Leur mécanisme d'action neurotoxique implique l'inhibition de l'AChE. Cette inhibition se réalise lorsque les organophosphorés vont se fixer sur le groupe hydroxyle de la serine du site actif de l'AChE, ce qui empêche la liaison de cette enzyme avec l'acétylcholine.

L'AChE est une enzyme estérase nécessaire au fonctionnement des synapses du système nerveux central et de la jonction neuromusculaire. En effet, cette enzyme extracellulaire hydrolyse en quelques millisecondes l'acétylcholine libre dans la fente synaptique, en acétate et choline. Elle fournit un des moyens de mettre un terme à l'activation des récepteurs cholinergiques (Pollard and Earnshaw, 2004).

L'inhibition de l'AChE provoque une accumulation de l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique lors d'une stimulation nerveuse, menant à une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques. En conséquence, le passage de l'information nerveuse est perturbé jusqu'au non fonctionnement des synapses (si la surstimulation est suffisante), ce qui peut mener à l'apparition de divers troubles nerveux (voir Chapitre 1.3.2) pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu (Lotti, 1995).

1.2.4 ÉVOLUTION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE AU COURS DE LA VIE.

Plusieurs isoformes de cette enzyme apparaissent au cours du développement du cerveau. Une forme libre et soluble (AChE-R), une forme dimérique (AChE-E) ainsi qu'une forme tétramérique et ancrée dans la membrane synaptique (AChE-S). Ces trois formes découlent de l'expression différente d'un même gène (Karpel *et al.*, 1994) et possèdent expérimentalement des capacités catalytiques identiques (Schwarz *et al.*, 1995).

La forme libre et cytoplasmique (AChE-R) ne se retrouve en grande concentration que dans les cellules embryonnaires et les cellules tumorales (Karpel *et al.*, 1994; Karpel *et al.*, 1996). Elle est également synthétisée en cas de stress (Kaufer *et al.*, 1998). La forme dimérique est associée à un lipide (glycosylphosphatidyl inositol) et reste ancré à la membrane des érythrocytes. La forme tétramérique découle d'un assemblage de monomères (AChE-S) immatures, qui se sont associés à une protéine de type collagène (*collagen-like*) afin de s'ancrer dans la membrane postsynaptique (Massoulie *et al.*, 1993). Cette forme n'apparaît que durant et après la formation des synapses fonctionnelles où elle joue son rôle catalytique envers l'acétylcholine (Drews, 1975; Layer and Sporns, 1987; Layer and Willbold, 1994).

L'activité catalytique de l'AChE augmente progressivement dans le jeune âge pour atteindre son maximum à l'âge adulte. Chez le rat, elle est de 30% au jour post-natal 5 (PND5), passe à 50% au PND 12, monte encore à 75% au PND 21 et atteint son maximum au PND 60 (Kousba *et al.*, 2007).

Le rôle catalytique de l'AChE au niveau de la transmission de l'influx nerveux dans les synapses ne survient donc que lorsque les synapses sont établies et fonctionnelles. Avant cela, l'enzyme joue un rôle dans le développement du cerveau. A cet égard, un certain nombre d'études ont démontré un rôle morphogénique de cette enzyme (Brimijoin and Koenigsberger, 1999). Elle jouerait en particulier le rôle de molécule d'adhésion lors du développement des processus neuronaux (Sharma and Bigbee, 1998; Bigbee *et al.*, 1999; Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru *et al.*, 1999). L'interaction entre AChE et certaines neurexines (protéines transmembranaires localisées sur la membrane présynaptique des neurones) serait responsable des changements architecturaux menant à la poussée des processus neuronaux (Grifman *et al.*, 1998). Le rôle morphogénique de l'enzyme serait également utile lors de la formation des synapses entre neurones (Robertson, 1987).

1.2.5 L'INHIBITION DE L'ACÉTYLCHOLINESTÉRASE PAR LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

La plupart des OP (dont le CPF et la PHO) sont synthétisés sous une forme assez peu toxique, dans laquelle le phosphore est lié à un soufre par une double liaison. La forme active des OP est leur métabolite dit « oxon », forme dans laquelle la double liaison P=S est substituée par une liaison P=O. C'est donc cette forme qui est plus particulièrement capable d'inhiber fortement la famille des cholinestérases dont l'AChE (Barr and Angerer, 2006). En ce qui concerne le CPF, il exerce cette action sur les cholinestérases, principalement via son métabolite actif, le CPF oxon (CPO).

L'interaction entre les formes « oxon » et l'AChE se fait de manière covalente par phosphorylation de la sérine du centre catalytique. Cette liaison entre les OP et l'AChE est irréversible avec la plupart des OP à l'exception des OP diméthyles (Lotti, 1995).

L'inhibition de l'enzyme AChE provoque une accumulation d'acétylcholine dans les synapses et une surstimulation des récepteurs muscariniques et nicotiniques provoquant un certain nombre de troubles et symptômes décrits plus bas dans les effets toxiques des OP (Costa, 2006).

1.2.6 MÉTABOLISME DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS ET DU CHLORPYRIFOS

Chez les mammifères, les OP sont rapidement métabolisés, principalement par le foie, même si une petite fraction reste stockée dans les tissus adipeux (Bakke and Price, 1976; Kamrin, 1997).

Cette métabolisation se fait par deux voies différentes. L'une d'entre elles est la désulfuration oxydative de la double liaison avec le phosphore, par un cytochrome P450 du foie (qui est spécifique à l'OP^{**}), qui donne lieu au métabolite oxon. On parle de bioactivation puisque l'on passe à une forme active, capable d'interagir avec les cholinestérases. Ce métabolite est hydrolysé par une A-estérase : paraoxonase 1 (PON-1) ou par une B-estérase en dialkylphosphate (DAP) et un métabolite organique inactif contenant le « *leaving group* » (voir chapitre 1.2.1). Si l'organophosphoré n'est pas converti en oxon, il peut, par une

^{**} Par exemple chez les humains : Cytochrome P450 (CYP) 2C19 pour diazinon, CYP3A4/5 et CYP2C8 pour parathion, CYP2B6 pour Chlorpyrifos (pour bioactivation)

seconde voie, être directement hydrolysé par un cytochrome P450 en son métabolite organique inactif et en dialkylthionate (Costa, 2006).

De cette manière (voir figure 1.1), le chlorpyrifos (CPF) est métabolisé par un Cytochrome P450 en Chlorpyrifos-Oxon (CPO), le métabolite actif. C'est la bioactivation du CPF. Il peut ensuite être hydrolysé par une A-estérase (la PON-1) ou une B-estérase en diéthylphosphate (DEP) et 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinal (TCP), ce dernier étant le métabolite inactif. C'est une des voies de détoxification du CPF. Il en existe une autre dans laquelle le CPF peut être directement hydrolysé en diéthylthiophosphate et TCP. Ce dernier métabolite est éliminé dans les urines sous forme de sulfates ou glucuronides de TCP (Barr and Angerer, 2006; Timchalk et al., 2006).

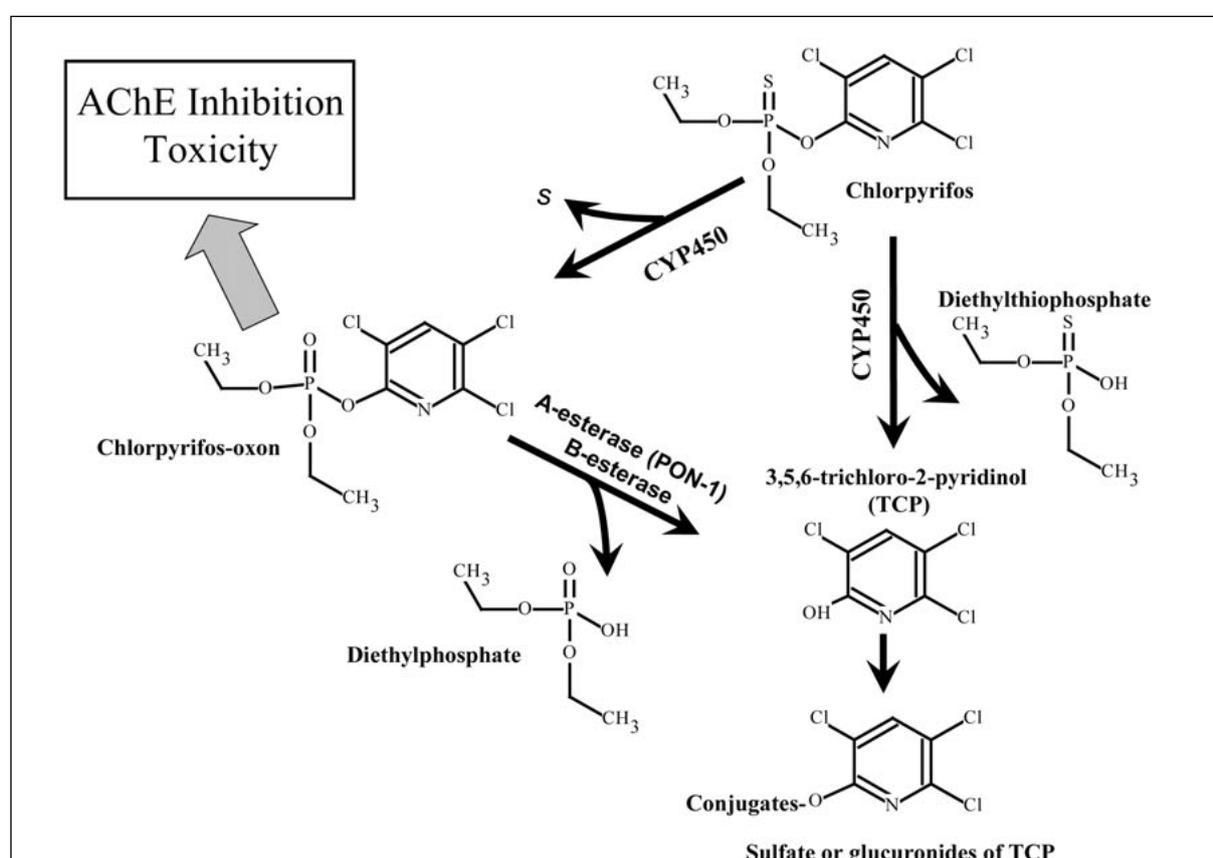


Figure 1.1 Schéma de la métabolisation du CPF (Timchalk et al., 2006)

Le métabolisme du CPF se réalise principalement dans le foie et dans une moindre mesure dans les entérocytes du petit intestin. Dans les deux cas, la voie d'activation (CPF en CPO) est mineure par rapport aux voies de désactivation (CPF en TCP et CPO en TCP). Ceci est valable tant chez l'Homme que chez les rongeurs. Cependant, dans les entérocytes, le rapport activation/désactivation du CPF est plus petit que dans le foie (Poet, 2003). Cette différence de métabolisme trouverait son origine dans la répartition des activités entre les enzymes de bioactivation et de détoxification. En particulier, l'enzyme PON1 qui désactive le CPO aurait une activité 100X plus basse dans les entérocytes que dans le foie (Pond et al, 1995). En d'autres termes, le métabolisme de l'intestin produit une plus grande fraction de CPO par rapport à celui du foie.

Le rôle métabolique de l'intestin a souvent été négligé lors d'expositions orales à de fortes doses de CPF car sa capacité métabolique est rapidement saturée, permettant à une grande fraction de la dose de CPF d'atteindre directement le foie via la circulation de la veine porte. En effet, il y aurait 10 fois moins d'activité métabolique de la plupart des enzymes cytochromes P450 dans le petit intestin que dans le foie et le petit intestin ne représente que 2% du poids du corps alors que le foie 4%. Pour des fortes doses d'insecticides, l'intestin ne jouerait donc qu'un rôle négligeable dans la métabolisation. Par contre, pour des doses d'expositions orales plus faibles, l'intestin représente le premier obstacle au CPF et peut avoir un impact important sur le niveau systémique ou la biodisponibilité du produit (Poet *et al.*, 2003).

Il y a donc une influence de la voie d'exposition (orale ou sous-cutanée) sur la métabolisation des OP, en tout cas, pour de petites doses de CPF (Marty *et al.*, 2007). D'autres facteurs influencent la métabolisation des OP comme le type de véhicule (huile de maïs, lait, diméthylsulfoxyde), la subdivision de la dose au cours de la journée (simple dose ou fractionnée) (Domoradzki *et al.*, 2004).

Évolution du métabolisme avec l'âge.

En général, les fonctions métaboliques se développent durant les 2 ou 3 premières semaines chez le rat et dans les 2 à 3 mois chez les enfants (Ginsberg *et al.*, 2004). Cependant, les données concernant l'évolution du métabolisme de certains produits comme les OP sont peu nombreuses (Timchalk *et al.*, 2007). L'activité des enzymes de métabolisation des OP dans le foie (Cytochrome P450, PON-1, B-Estérases) des nouveau-nés et des jeunes individus est plus

faible que chez l'adulte, ceci tant chez l'Homme que les rongeurs (Augustinsson and Barr, 1963; Mueller *et al.*, 1983; Johnson, 2003). L'équilibre entre la bioactivation métabolique du CPF et la désactivation ou détoxification, qui est responsable de la susceptibilité à la toxicité des OP, dépend donc de l'âge. Il y a plus de bioactivation, donc plus de production de CPO chez les jeunes que chez les adolescents et adultes (Ma and Chambers, 1994).

1.2.7 TOXICITÉ AIGÛE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS CHEZ LES INSECTES.

Une des principales raisons pour lesquelles ces substances insecticides sont plus toxiques pour les insectes que chez les mammifères adultes, dont l'Homme, provient des capacités métaboliques de chacun et des voies de métabolisation. En effet, les insectes possèdent comme voie majeure de métabolisation celle de la bioactivation, dans laquelle les OP sont transformés en oxon, leur métabolite actif. Au contraire, les mammifères privilégient les voies de détoxification directe et ont une voie de détoxification des oxon bien développée (De Graham *et al.*, 2002).

1.3 NEUROTOXICITÉ AIGÛE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

1.3.1 NEUROTOXICITÉ

La neurotoxicité est définie comme un changement structural ou une altération fonctionnelle du système nerveux, qui trouve son origine dans l'exposition à des agents physiques, biologiques ou chimiques (Philbert *et al.*, 2000). Les effets neurotoxiques impliquent l'entrée de l'agent dans l'organisme, son interaction avec des cibles cellulaires spécifiques et l'initiation de changements biologiques menant à des altérations fonctionnelles du système nerveux (Philbert *et al.*, 2000). Chez les adultes, la neurotoxicité touche plus facilement le système nerveux périphérique car le système nerveux central est protégé d'une série d'agents chimiques par la barrière hémato-méningée (Costa *et al.*, 2004). Cependant, certaines substances très petites ou lipophiles, telles que les OP sont susceptibles de passer cette barrière et d'atteindre le système nerveux central (Costa *et al.*, 2008).

1.3.2 FORMES ET CAUSES DE NEUROTOXICITÉ PRODUITES PAR LES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

Suite à des accidents d'exposition à une dose forte et unique dite « dose aigüe » d'OP, il a été décrit une série de troubles survenant successivement dans le temps (Salvi *et al.*, 2003).

Syndrome cholinergique aigu.

Ce syndrome survient dans les minutes ou les heures suivant l'ingestion d'une forte dose d'insecticide OP qui donne au moins 70 % d'inhibition de l'AChE (Clegg and van Gemert, 1999). Il se caractérise par l'apparition d'une grande variété de symptômes, liés à l'hyperstimulation du système nerveux cholinergique postsynaptique nicotinique et muscarinique, incluant salivation, lacrymation, miction, défécation, changements du rythme cardiaque, maux de tête, nausées, dilatation pupillaire, vomissements, convulsions, coma menant parfois à la mort (Lotti, 1995; Keifer and Mahurin, 1997; Kamel and Hoppin, 2004; Carr and Nail, 2008). L'intensité et le type de symptôme(s) provoqué(s) sont en relation avec le niveau d'exposition à ces OP (Lotti, 1995).

Le syndrome intermédiaire.

Ce syndrome survient dans les 24 à 96 heures après l'exposition aux OP. Il consiste en l'apparition de faiblesses musculaires, pouvant toucher entre autres le système respiratoire (Keifer and Mahurin, 1997). En outre de ces troubles musculaires sont également décrits des symptômes d'anxiété et des signes de dépression (Moretto, 1998).

Le syndrome de (poly)neuropathie retardé.

Ce syndrome survient quelques semaines après une exposition à une forte dose d'OP et implique un certain nombre de symptômes : un manque de sensibilité, des crampes et de la fatigue musculaire, surtout au niveau des jambes. Ce syndrome retardé serait la conséquence d'axonopathies distales sensibles et motrices et même de dégénérescences axonales, qui suivraient l'inhibition d'une enzyme du système nerveux périphérique : la « *neuropathy-target esterase* » (Aiuto *et al.*, 1993; Lotti *et al.*, 1995; Keifer and Mahurin, 1997).

Effets additionnels de la toxicité aigüe.

Ces symptômes de toxicité aigüe s'accompagnent parfois de troubles persistants à long terme. Il s'agit de déficits des fonctions psychomotrices et cognitives, de pertes de sensibilités et de fonctions motrices. Ces effets surviendraient encore jusqu'à 10 ans après une intoxication, ce

qui suggère la lenteur de l'apparition et la grande permanence de ces troubles (Savage *et al.*, 1988). Des études épidémiologiques et sociodémographiques ont également montré une association entre toxicité aux OP et l'incidence de troubles psychiatriques tels que la dépression (Jaga and Dharmani, 2007). En particulier, des fortes doses de CPF peuvent donner des syndromes d'anxiété et de dépression à long terme après une ingestion chez de jeunes enfants (Aiuto *et al.*, 1993).

Ces troubles peuvent donc survenir suite à une exposition à une dose aiguë d'un OP et sont liés à une forte inhibition de l'AChE, au dessus du seuil de toxicité aiguë du produit. Cependant, l'exposition à une dose aiguë n'est pas la seule manière d'atteindre le seuil. En effet, une exposition chronique à des doses qui, à elles seules, ne dépassent pas le seuil de toxicité aiguë, peut conduire progressivement à une inhibition de l'AChE suffisante à produire un effet toxique et donc les symptômes correspondants décrits plus haut. Pour un insecticide OP donné, il existe donc une limite d'exposition à une dose forte unique (aiguë) et une limite à l'exposition chronique à partir de laquelle des effets toxiques observables peuvent survenir. Par exemple, concernant l'exposition orale au CPF chez le rat adulte, la dose à partir de laquelle on observe des effets liés à l'inhibition de l'AChE est au dessus de 15 mg/kg en dose aiguë et 7,5 mg/kg par jour en doses chroniques (Zheng *et al.*, 2000).

1.4 NEUROTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

1.4.1 LA NEUROTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE.

Il existe donc une autre forme de neurotoxicité, c'est-à-dire une autre manière de perturber le fonctionnement et l'intégrité du système nerveux central (SNC). Il s'agit de la neurotoxicité développementale (Rodier, 1995). Nous allons voir que le développement du cerveau est particulièrement sensible à une série de perturbateurs, et que cette perturbation peut mener à toute une série d'altérations structurales et fonctionnelles persistantes.

1.4.1.1 Les perturbateurs du développement du cerveau

Le développement du cerveau peut être perturbé par certains médicaments antiépileptiques, par l'éthanol provenant par exemple des boissons alcoolisées (Costa *et al.*, 2004), par la nicotine (Slotkin, 2004; Slotkin, 2008) et par les fluorides (contaminant naturel de l'eau)

ainsi que par une série de substances industrielles telles que le méthylmercure, l'arsenic, les biphényles polychlorés (PCB), une série de solvants, le manganèse (agent antidétonant présent au départ dans les produits pétroliers et contaminant ensuite l'eau), le perchlorate d'ammonium (un fuel solide propulseur pour les missiles et roquettes contaminant le sol) (Grandjean and Landrigan, 2006). Le développement du cerveau peut être également altéré par les pesticides parmi lesquels sont bien représentés les insecticides, et en particulier les insecticides neurotoxiques de la famille des OP (Costa *et al.*, 2004; Colborn, 2006; Grandjean and Landrigan, 2006; Bjorling-Poulsen *et al.*, 2008).

La liste des produits et substances capables d'altérer le développement du cerveau pourrait s'allonger avec les études les concernant. En effet, nous verrons également que beaucoup de signaux et molécules impliqués dans la formation du SNC (cerveau et moelle épinière) sont également impliqués dans le fonctionnement du SNC adulte. En conséquence, toute substance dont les vertus neurotoxiques ont été démontrées serait susceptible d'interférer avec le développement du système nerveux central (Grandjean and Landrigan, 2006).

1.4.1.2 Sensibilité particulière du cerveau en développement.

Une raison pour laquelle le système nerveux central en développement est plus sensible aux substances neurotoxiques que lorsqu'il atteint sa maturité provient du fait qu'il est plus susceptible d'être exposé à des toxiques. En effet, premièrement la barrière hémato-méningée n'achève sa formation que tardivement : elle ne se termine chez l'Homme que 6 mois après la naissance, laissant la porte ouverte aux toxiques (Adinolfi, 1985; Rodier, 1995). Deuxièmement, le rôle de la barrière placentaire s'avère également insuffisant pour empêcher l'entrée de nombreuses substances chimiques dans le corps et le cerveau (Andersen *et al.*, 2000).

Troisièmement, les capacités métaboliques et donc les mécanismes de détoxification atteignent leur maturité seulement après la naissance : fin de la 2^{ème} à la 3^{ème} semaine après la naissance chez le rat et du 2^{ème} au 3^{ème} mois après la naissance chez l'Homme (Ginsberg *et al.*, 2004). Même si le moment exact de la maturité métabolique n'est pas connu exactement, on sait que le métabolisme du CPF est déjà en partie présent dès la naissance et qu'il devient plus performant ensuite (Timchalk *et al.*, 2006; Timchalk *et al.*, 2007).

Quatrièmement, un autre phénomène lié à la détoxification génère une plus grande susceptibilité du cerveau en développement d'être atteint par des neurotoxiques. En effet, le

CPO (forme active du CPF) peut interagir avec une série de protéines du sérum (*serum binding proteins*) qui permettent par cette interaction diminuer sa capacité à atteindre le cerveau (Kousba *et al.*, 2004). Cependant, la concentration de ces protéines du sérum est faible durant le développement et augmente avec l'âge pour jouer un rôle plus efficace chez l'adulte. Par exemple, chez le rat, leur concentration passe de 7 à 12 % du jour postnatal 4 à 90 (Mortensen *et al.*, 1998).

Une autre raison de la sensibilité particulière du cerveau en développement aux toxiques relève de la complexité du développement et des très faibles capacités de réparation possible de cet organe. En effet, durant la vie fœtale, quelques cellules ectodermiques dorsales embryonnaires doivent constituer rapidement des milliards de cellules spécialisées, fortement interconnectées. De plus, pour obtenir un développement optimal, les neurones doivent migrer selon des processus précis, depuis leur point d'origine vers un emplacement précis, assigné, pour y établir des connections nerveuses. Chacun de ces processus du développement du cerveau doit prendre place à la fois à un moment et dans un ordre précis (Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000; BJORLING-POULSEN *et al.*, 2008).

Toute perturbation de chacun des processus au cours du développement du cerveau peut mener à des troubles de son fonctionnement chez l'adulte, des troubles qui pourront s'avérer irréversibles et donc persistants car il existe peu de capacité de réparation dans le cerveau adulte (Grandjean and Landrigan, 2006).

1.4.1.3 Développement du cerveau et période de sensibilité à la toxicité développementale chez les mammifères

Chez l'Homme, une grande partie du développement du cerveau, comprenant les principales phases de prolifération des neurones, se réalise durant les 9 mois de la vie fœtale (Grandjean and Landrigan, 2006). Cependant, même si pratiquement tous les neurones sont formés à la naissance, le développement du cerveau doit encore se compléter par la synaptogenèse et par la myélinisation des neurones qui se déroulent donc encore après la naissance, et se prolongent même durant quelques années.

En conséquence la période sensible à l'altération du développement du cerveau est une large période qui ne se limite pas à la période embryonnaire et fœtale, mais se prolonge à l'enfance et même à l'adolescence (Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000).

Le cerveau des rongeurs est utilisé comme modèle d'étude du développement du cerveau humain car leurs développements sont semblables en de nombreux points. En effet, le développement du cerveau comprend une succession d'étapes dont la séquence s'établit dans le même ordre chez l'Homme que chez les rongeurs (notamment chez rats et souris). Aussi, même si la vitesse du développement du cerveau est beaucoup plus rapide chez les rongeurs, la durée de ces étapes est proportionnelle.

Par contre, une grande différence entre le développement des rongeurs et de l'Homme est que la naissance se place plus tôt chez les rongeurs dans la séquence des phases du développement du cerveau. Par exemple, il a été établi que la première semaine postnatale chez le rat correspond au troisième trimestre de grossesse chez l'Homme. Ce décalage du moment de la naissance devrait être pris en compte lors de l'évaluation des périodes critiques du développement (Rice and Barone, 2000).

Donc, chez les rongeurs, seule une partie du développement du cerveau se réalise durant la période de gestation (22 jours chez le rat et 19 à 20 jours chez la souris), et le reste du développement se produit durant les premières semaines de la vie postnatale et même durant l'adolescence (Rice and Barone, 2000).

1.4.1.4 Possibilités d'exposition de l'Homme aux insecticides durant le développement du cerveau.

En dehors du cadre d'une exposition accidentelle de type aigu, il existe une série de voies par lesquelles les embryons, fœtus ou enfants peuvent être exposés chroniquement aux insecticides. En effet, fruits, nourritures pour bébé, eau peuvent contenir des résidus d'insecticides (Stepan *et al.*, 2005; Bjorling-Poulsen *et al.*, 2008). Il a été démontré que l'utilisation d'OP, comme le CPF, dans les maisons pouvait conduire à une exposition des enfants via les mères ou directement par contact cutané ou oral avec les jouets, par exemple (Gurunathan *et al.*, 1998).

1.4.1.5 Les effets développementaux retardés

Les perturbations du programme du développement par des agents chimiques environnementaux, qui surviennent durant cette longue phase du développement du cerveau, c'est-à-dire durant la vie fœtale ou pendant l'enfance, peuvent créer des altérations du cerveau

qui se révèlent être insuffisantes pour être perceptibles immédiatement, mais qui peuvent engendrer de gros problèmes fonctionnels qui émergeront plus tard dans la vie, lorsque ces comportements seront sollicités (Costa *et al.*, 2004). Nous verrons plus loin que ce peut être le cas pour certains OP. En conséquence, l'âge des sujets humains ou animaux sera un facteur important lors de l'étude des effets développementaux.

1.4.2 LE DÉVELOPPEMENT DU SNC ET LES INTERFÉRENCES POSSIBLES AVEC LES SUBSTANCES NEUROTOXIQUES.

Le développement du cerveau est très complexe et se fait sur plusieurs plans en parallèle. En l'occurrence, il se fait sur un plan anatomique, tissulaire et cellulaire en même temps. Nous allons ici résumer les étapes de la mise en place des grandes structures du cerveau, ainsi que la succession des phases cellulaires qui mènent à la formation des tissus qui forment ces structures. Nous débuterons par la mise en place des différentes structures au point de vue anatomique et nous verrons ensuite les mouvements et transformations cellulaires menant à la mise en place de ces structures et à leur bon fonctionnement.

1.4.2.1 Formations anatomiques.

Au niveau anatomique, la formation du cerveau se réalise en 3 grandes phases : la formation de la plaque neurale, la formation du tube neural et sa différenciation pour former les grandes aires du cerveau adulte.

Formation de la plaque neurale.

La toute première étape de la formation du système nerveux est un épaississement des cellules cylindriques de l'épithélium dorsal de l'ectoderme afin de former la plaque neurale. C'est la notochorde qui induit cette formation et donne un axe sagittal à l'ébauche du système nerveux central.

Neurulation et formation du tube neural.

Une fois la plaque neurale formée, survient alors la deuxième étape de la formation du SNC : la neurulation. Durant cette étape se déroulant la troisième semaine de grossesse chez l'Homme, la plaque neurale va former des crêtes dorsales parallèles (axe longitudinal) dont la hauteur va grandir de manière à former une gouttière neurale sagittale à ouverture supérieure. Les bords de la gouttière neurale vont progressivement se rapprocher puis se souder pour

former un tube, recouverts par l'ectoderme dorsal. C'est à la fin de la troisième semaine de grossesse chez l'Homme que débute la fermeture de la gouttière neurale, au niveau du cerveau postérieur juste au dessus de l'extrémité antérieure de la notochorde. Cette fermeture va ensuite se propager vers l'avant et vers l'arrière à la manière d'une fermeture éclair. La progression vers l'avant crée un gradient de développement caudo-rostral au niveau de l'ébauche du futur cerveau. La fermeture du tube neural (fermeture du neuropore antérieur) se déroule entre le jour de grossesse (GD) 24 et 26 chez l'Homme et au GD 10,5 chez le rat alors que la fermeture vers l'arrière se déroule entre le GD25 et 28 chez l'Homme et durant le GD 11,5 chez le rat (DeSesso, 1996).

Alors que le tube neural n'est qu'en formation, une population de cellules de l'ectoderme vont se séparer du bord des gouttières de l'ectoderme pour former les crêtes neurales qui donneront les ébauches des ganglions sensitifs des nerfs craniaux et spinaux, les cellules de Swann (qui myéliniseront les nerfs périphériques), les méninges (qui couvriront le cerveau et la moelle épinière), et quelques autres éléments comme les structures squelettiques et musculaires du visage.

Le tube neural se détache progressivement de l'ectoderme superficiel suite à des modifications des protéines d'adhésion entre cellules de l'ectoderme et du tube neural. Il s'agirait du remplacement progressif de N-cadhérine par des N-CAM.

La différenciation du tube neural.

Dès le début de la deuxième semaine chez les rongeurs (rat : GD9,5 ; souris : GD7) et dès le début du premier mois de grossesse chez l'Homme, le tube neural commence à se différencier dans sa partie antérieure pour former progressivement le cerveau et postérieurement la moelle épinière. En effet, dans sa partie antérieure, le tube neural forme des renflements et des rétrécissements qui sont les ébauches des ventricules latéraux et des différentes régions de l'encéphale qui l'entourent.

Au niveau du timing, les parties les plus postérieures du cerveau commencent à se distinguer en premier lieu, au cours de la fin de la deuxième semaine de gestation chez le rat (GD 10-16) et entre la 3^{ème} et la 7,5^{ème} semaine chez l'Homme. Une exception est le cervelet qui se développera beaucoup plus tard (Rice and Barone, 2000). Les structures prosencéphaliques, le

thalamus et l'hypothalamus débutent leur développement en fin de période embryonnaire et en début de période fœtale chez rongeurs et chez l'Homme.

Enfin, débute la mise en place des structures du cerveau antérieur : le néocortex et l'hippocampe. Ces deux formations du cerveau sont particulièrement complexes. En effet, elles adopteront une structure de type laminé. Leur formation débute par une première phase de développement avant la naissance donnant lieu à une ébauche primaire, alors qu'une autre phase de développement se déroulera après la naissance et formera progressivement les différentes couches superposées.

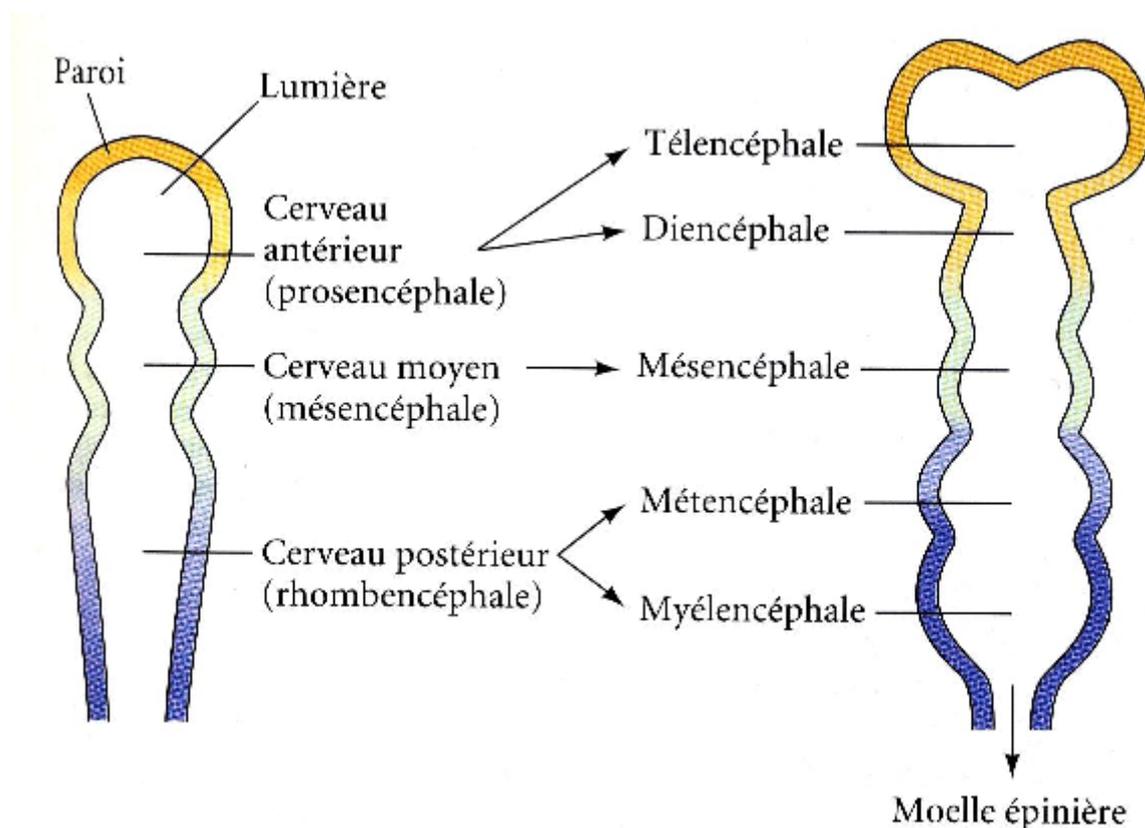


Figure 1.2 : Ebauche des premières structures du cerveau (Gilbert, 2004)

1.4.2.2 Principales fonctions des différentes grandes structures du cerveau.

Bien qu'il existe une grande interconnexion entre les grandes structures du cerveau, et que la complexité des comportements fait participer plusieurs structures pour un comportement donné, il a été établi une certaine responsabilité spécifique de chacune des grandes structures du cerveau pour l'organisation des grandes fonctions assurées par le cerveau. Ces grandes structures ainsi que leurs fonctions trouvent de grandes similitudes chez l'Homme et les rongeurs.

Dans les grandes lignes^{§§}, le bulbe rachidien est responsable des fonctions autonomes, des cycles éveil-sommeil. Les structures mésencéphaliques peuvent être impliquées dans les processus cognitifs et dans les processus d'attention. Le cervelet assure des fonctions motrices et participe à l'apprentissage moteur. Il a un rôle également dans certains processus cognitifs. Certaines aires du cerveau antérieur sont également impliquées dans les fonctions motrices et dans certains types d'apprentissage. Le système limbique, qui se trouve dans le lobe temporal médial et qui comprend l'hippocampe, l'amygdale et les structures corticales environnantes est responsable de la mémoire à court terme et spatiale comme des formes d'apprentissage correspondantes.

Le néocortex, quant à lui se subdivise en plusieurs aires fonctionnelles motrices et sensibles spécifiques à de nombreuses fonctions incluant la vision, l'audition et de nombreuses modalités neurosensorielles. Chacune de ces aires se divise en cortex primaire qui reçoit les afférences thalamiques spécifiques et en nombreuses autres aires d'où partent des efférences responsables d'un plus haut niveau d'intégration. La taille relative et l'importance fonctionnelle des aires corticales préfrontales sont différentes chez l'Homme et les rongeurs et sont en relation avec l'importance des fonctions qu'elles traitent. Par exemple, les hommes ont des aires visuelles plus développées alors que les rongeurs ont des aires olfactives et auditives plus développées. Chez les rongeurs, le cortex préfrontal est nécessaire pour beaucoup de fonctions complexes, comme l'organisation temporelle et spatiale des comportements, la planification de comportements, l'inhibition des actions inappropriées, la capacité à changer de stratégie, le contrôle émotionnel, et joue des rôles dans les processus liés à l'attention (Rice and Barone, 2000).

Une altération comportementale peut être donc associée à l'altération du fonctionnement d'une partie ou de plusieurs parties du cerveau.

1.4.2.3 Formations cellulaires et tissulaires

Si la formation des différentes structures du cerveau se fait à des âges différents, elle requiert cependant toujours la même série de phénomènes successifs au niveau cellulaire : une phase de prolifération cellulaire, une phase de migration, une phase de différenciation, une phase de synaptogenèse et de myélinisation. Nous devons ajouter à ces séquences une phase de mort cellulaire programmée ou apoptose, ainsi qu'une phase de limitation du nombre de synapses. Ces phases successives se déroulent donc, pour chaque type neuronal et pour chacune des

^{§§} Nous précisons dans la discussion le rôle précis des formations du cerveau pour un comportement étudié lorsque cela s'avèrera plus utile.

structures qu'ils vont former, avec un certain décalage durant le développement (figure 1.3). L'ordre et le moment dans lequel se réalise la succession de ces événements est important pour le bon développement du cerveau et son fonctionnement. Aussi, l'interruption ou l'altération d'une séquence aura des conséquences sur le bon développement du cerveau (Rodier, 1980; Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000).

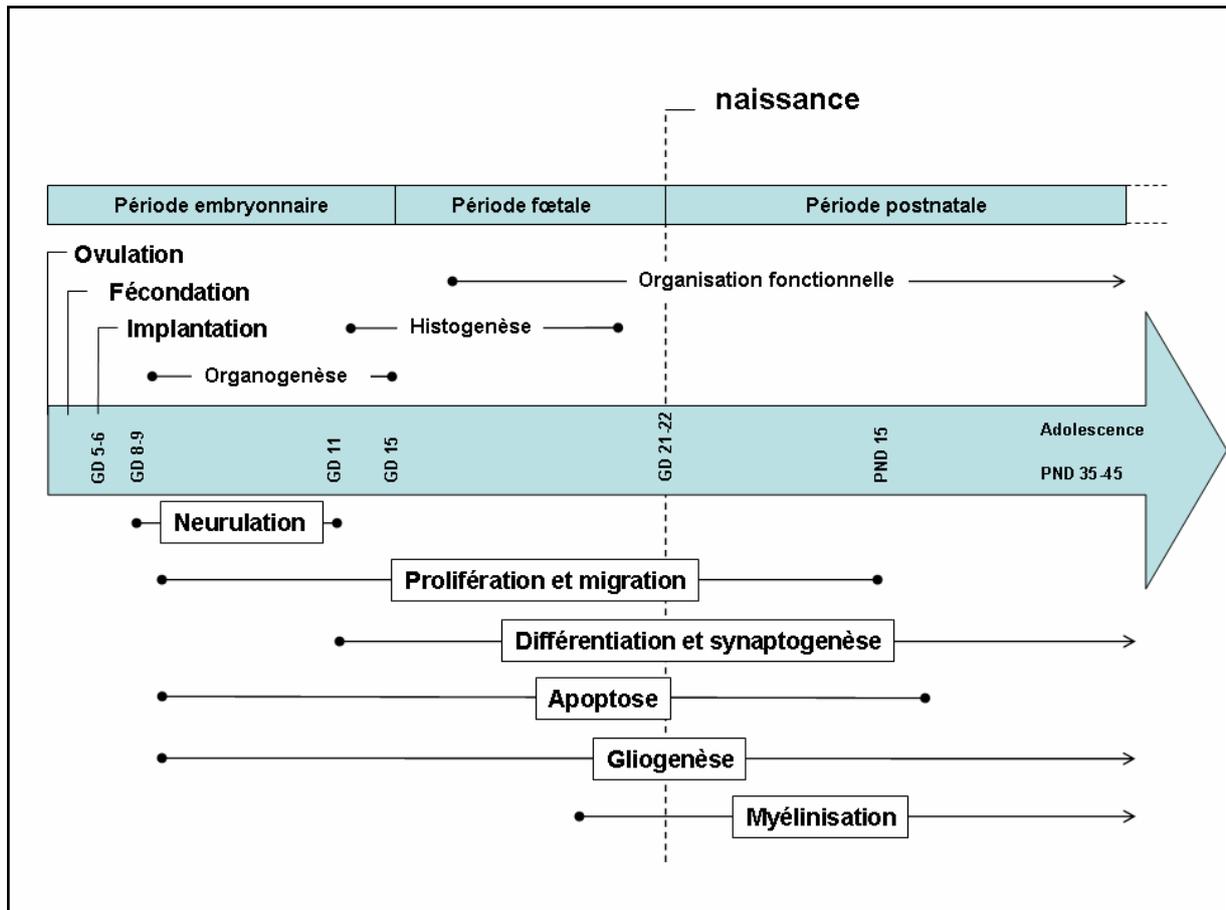


Figure 1.3 Déroulement temporel des différentes phases du développement du cerveau de rat ; adapté de Rice and Barone (Rice and Barone, 2000).

Phases de Prolifération cellulaire.

La formation d'un type neuronal correspondant à une future structure spécifique débute donc par une phase de divisions cellulaires à partir de quelques cellules précurseurs du tube neural : on parle de neurogenèse. Le moment durant lequel se déroule chaque phase de prolifération mais aussi la durée et l'intensité de chaque phase de prolifération sont spécifiques au type neuronal et à la structure du cerveau que ces cellules formeront (figure 1.4).

Les premières phases de prolifération correspondent à la formation du bulbe rachidien et au diencephale et sont relativement courtes au vu de la situation postérieure et de la relative simplicité de ces structures. Par contre, les phases de prolifération pour la formation des structures plus antérieures comme le cortex cérébral et l'hippocampe surviennent un peu plus tard dans le développement. Le cervelet est une exception car même s'il est en position postérieure, il se développe tard comparé aux autres structures aussi postérieures. La formation de ces structures complexes (cortex cérébral, hippocampe et cervelet) requiert plusieurs phases de prolifération (et également de migration), qui se déroulent jusqu'à quelques mois après la naissance chez l'Homme (Rodier, 1980; Rodier, 1995).

La première phase de prolifération cellulaire concernant la formation du cortex cérébral ou néocortex débute au 12^{ème} jour de gestation chez le rat à partir de précurseurs cellulaires pseudostratifiés de la zone ventriculaire du tube neural. Juste après survient une seconde phase de prolifération des cellules de la zone subventriculaire. Ces phases de prolifération se déroulent principalement entre le GD 13 et 18 (rat), bien que certaines cellules continuent à se diviser jusqu'à la fin de la gestation (GD 21-22) chez le rat (Bayer *et al.*, 1991; Rakic and Caviness, 1995). Les phases de la prolifération qui donnent lieu à la formation du néocortex cérébral se déroulent entre la fin de la 5^{ème} semaine et la fin de la 19^{ème} semaine chez l'Homme (Rice and Barone, 2000).

La formation de l'hippocampe comporte une succession de phases de prolifération correspondant à la formation des différentes parties de celui-ci. Une première phase prénatale de prolifération (à partir de GD 15 jusqu'à la fin de la gestation chez le rat et fin de la 6^{ème} semaine de gestation jusqu'à la 15^{ème} semaine de grossesse chez l'Homme) donnera le subiculum et les couches CA1 et CA3 de l'hippocampe alors qu'une seconde phase de prolifération plus tardive [fin de la gestation (GD 19) chez le rat et 10^{ème} semaine de grossesse chez l'Homme] et qui dure longtemps après la naissance concerne les cellules granulaires qui formeront la couche granulaire du gyrus dentelé de l'hippocampe (Bayer, 1980; Rice and Barone, 2000).

La formation du cervelet requiert une première phase de prolifération de cellules nerveuses qui migreront pour former le cervelet primaire et nécessite ensuite une seconde phase de prolifération cellulaire qui migreront pour former la couche granulaire externe du cervelet. La première phase de prolifération débute au GD 12 chez le rat et au début du premier mois de grossesse chez l'Homme alors que la seconde phase de prolifération commence après la naissance chez le rat et dans le troisième trimestre de grossesse et se prolonge après la naissance chez l'Homme (Rice and Barone, 2000).

Une perturbation de la prolifération des précurseurs cellulaires touchera donc un ou plusieurs types cellulaires particuliers, correspondant à une structure ou à plusieurs structures en fonction du moment précis et de la longueur de cette perturbation (Costa *et al.*, 2004). Toute une série d'agents chimiques sont capables de perturber la prolifération cellulaire durant la gestation dont : l'éthanol (Miller, 1996; Guerri, 1998), le méthylmercure chez les rongeurs (Rodier *et al.*, 1984; Ponce *et al.*, 1994) et chez l'Homme (Choi, 1989), mais aussi des OP (Whitney *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1998a; Song *et al.*, 1998).

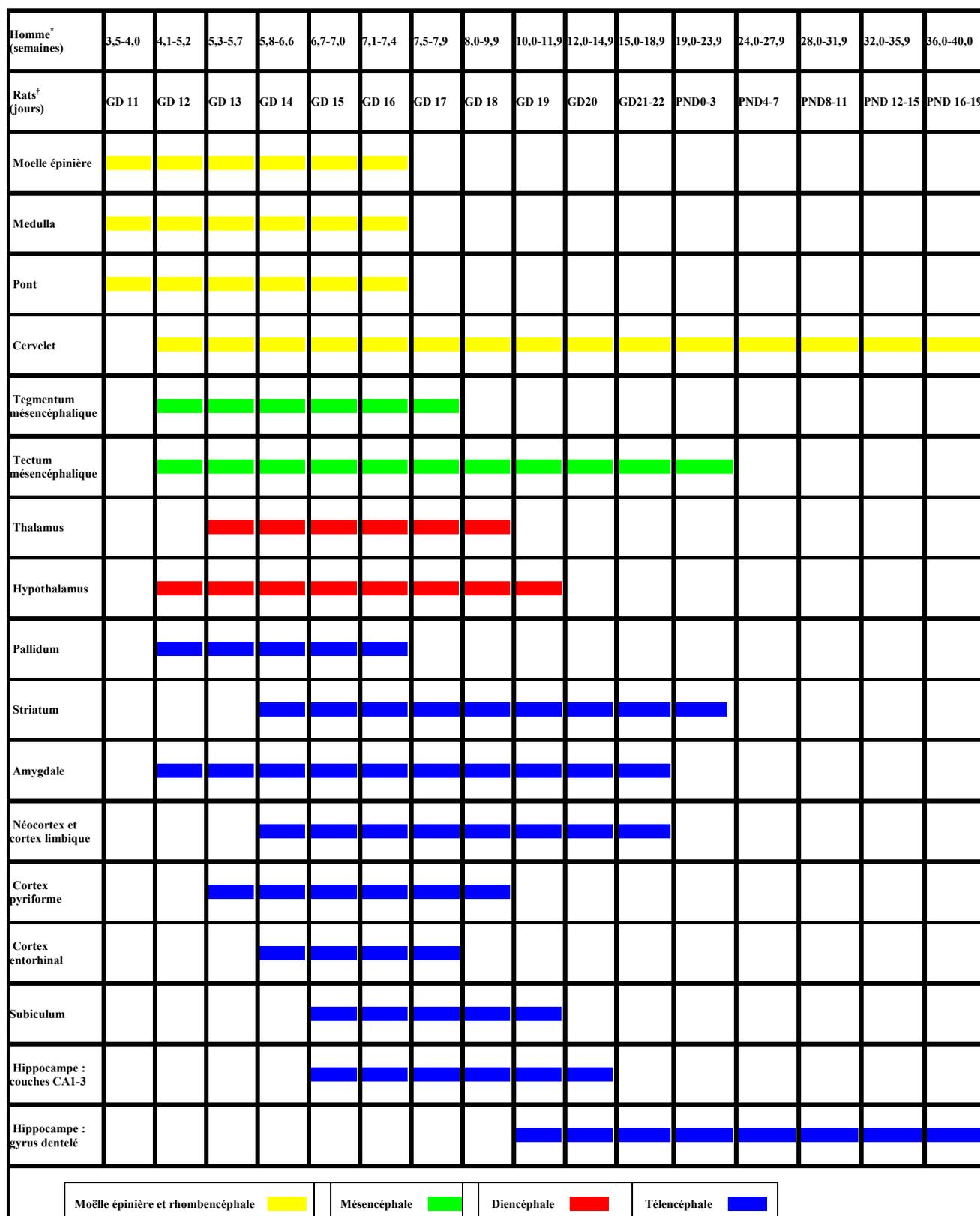


Figure 1.4 : Occurrence au cours du temps des phases de prolifération cellulaire pour la mise en place des grandes structures du cerveau (Rice and Barone, 2000)

* Temps estimé ; † données déterminées expérimentalement.

Phases de Migration.

Pour chaque type cellulaire, une phase de prolifération va être suivie par une phase de migration. On assistera donc au cours du temps à une ou plusieurs vagues de migration cellulaire pour chaque partie du cerveau (Rodier, 1995).

C'est durant cette phase de migration qu'une partie des cellules issues de la phase de prolifération va se déplacer selon un processus précis afin d'atteindre un endroit particulier du cerveau. L'endroit où doit migrer une cellule neuronale est stratégique pour l'obtention d'une fonction donnée car le contact et l'interaction entre les cellules sont importants pour la différenciation cellulaire et la construction de circuits complexes fonctionnels.

La différenciation cellulaire.

Il s'agit du processus par lequel les neuroblastes vont trouver leur phénotype final. Ce processus débute dès la dernière division et continue durant la migration. C'est au cours de la migration que des facteurs extracellulaires et intracellulaires vont influencer l'expression de gènes particuliers qui détermineront le phénotype final et donc une série de caractéristiques, comme la forme, la taille, la polarité, et l'expression de certains types de récepteurs et neurotransmetteurs.

Une série d'agents environnementaux peut altérer la différenciation : l'éthanol (Laev *et al.*, 1995; Valles *et al.*, 1996; Valles *et al.*, 1997; Lauder and Schambra, 1999), le méthylmercure (Barone *et al.*, 1998), le plomb (Petit and LeBoutillier, 1979; Alfano and Petit, 1982; Petit *et al.*, 1983; Barone *et al.*, 1998), la nicotine (Frischer *et al.*, 1988; Slotkin *et al.*, 1993; Pennington *et al.*, 1994; Cutler *et al.*, 1996; Levitt, 1998; Audesirk and Cabell, 1999) et certains OP (Song *et al.*, 1998; Crumpton *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001).

La synaptogenèse

Il s'agit de l'établissement des liens de communications entre neurones, sous forme de synapses et consiste en des changements physiologiques des éléments pré- et postsynaptiques. La synaptogenèse se déroule progressivement au cours des trois premières semaines postnatales chez le rat et se poursuit jusqu'à l'adolescence chez l'Homme (Bourgeois *et al.*, 1994; Bourgeois, 2005).

C'est durant cette période que le réseau fonctionnel de base va se mettre en place même si de nouvelles synapses pourront s'ajouter durant toute la vie (Rodier, 1995). L'établissement des premières interactions entre les neurotransmetteurs et leurs récepteurs induisent des conséquences permanentes pour la suite (Lauder, 1988). En effet, la quantité de

neurotransmetteurs émise par un neurone peut influencer définitivement le nombre de récepteurs des cellules réceptrices (Rosengarten and Friedhoff, 1979). On sait également que le phénotype de la cellule réceptrice est influencé par la nature des neurotransmetteurs qu'elle reçoit (Black, 1982).

La synaptogenèse peut être altérée par toute une série de toxiques et substances environnementales et ceci durant une période postnatale relativement longue. Parmi ces substances ont été répertoriées l'éthanol (Volk, 1984; Lancaster *et al.*, 1989), certains métaux lourds et dérivés comme le plomb (McCauley *et al.*, 1982; Hoff, 1988) et le méthylmercure (Zanoli *et al.*, 1994), des inhibiteurs de la synthèse de la sérotonine (Mazer *et al.*, 1997), des PCB (Eriksson, 1997) ainsi que certains OP tels que le parathion (Veronesi and Pope, 1990), le diisopropylfluorophosphate (DFP) (Eriksson, 1997) et le CPF (Levin *et al.*, 2002).

Après cette phase de synaptogenèse, dans laquelle le maximum de connections, de synapses est atteint au moment du sevrage chez le rat (Bedi *et al.*, 1980) et à l'âge de deux ans chez l'Homme (Huttenlocher and de Courten, 1987), s'établit une longue période de destruction d'une partie des synapses. Ce phénomène qui dure bien plus longtemps que la mort cellulaire programmée après la phase de prolifération, limite le nombre de synapses et paraît sensible à certains toxiques également (Rodier, 1995).

Gliogenèse et myélinisation des neurones.

Un autre type cellulaire issu également de précurseurs cellulaires du tube neural (sauf la microglie) et participant à la formation du cerveau va également subir une série de phases de prolifération : les cellules gliales. On en décrit plusieurs types : microglie, glie radiaire, oligodendrocytes, astrocytes et cellules de Swann, qui se développent à des moments différents du développement du SNC et ont des fonctions particulières tant dans les processus du développement et la mise en place des cellules neuronales que dans le fonctionnement du cerveau adulte (Watson, 1974).

La plus grande partie de la gliogenèse est très rapide et se réalise durant la 2^{ème} et 3^{ème} semaine postnatale chez le rat et durant le troisième trimestre de grossesse chez l'Homme (Dobbing and Sands, 1973; Dobbing, 1974), au moment où pratiquement toutes les cellules neuronales sont déjà produites (Dobbing, 1974).

Cette période de prolifération des cellules gliales dont on connaît la grande sensibilité à un tas de toxiques : alcool, nicotine mais aussi certains OP comme le CPF (Campbell *et al.*, 1997; Slotkin, 1999; Monnet-Tschudi *et al.*, 2000) est donc une voie importante de la toxicité développementale (Costa *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008).

La microglie et la glie radiaire se développent durant la neurogenèse de la plupart des structures du cerveau, alors que les oligodendrocytes et astrocytes prolifèrent en général après les vagues de migration des neurones (Mission *et al.*, 1991). Ces moments de prolifération correspondent à leur intervention dans le développement du cerveau. En effet, le rôle de la glie radiaire est de fournir un schéma, un squelette de base pour orienter la migration des cellules neuronales (Soriano *et al.*, 1997) et celui de la microglie est d'éliminer par phagocytose les débris et cellules mortes durant l'apoptose (Cuadros and Navascues, 1998).

En général, la prolifération des oligodendrocytes et astrocytes se réalise bien après celle des cellules neuronales, et leur différenciation suit celle des cellules neuronales (Wiggins, 1986). Les astrocytes ont pour fonction de maintenir les bonnes conditions du milieu extracellulaire (équilibres ioniques et trophiques) alors que les cellules de Swann et oligodendrocytes vont myéliniser les axones des neurones dans le SNC (et périphérique) (Rice and Barone, 2000).

La myélinisation des axones ne se déroule donc qu'après les phases de prolifération et de migration des cellules neurales (Miller and Ono, 1998) et ne se termine que très tardivement (durant l'adolescence chez le rat et chez l'Homme), ce qui prolonge encore la période sensible pour la toxicité développementale (Dobbing and Sands, 1973; Mission *et al.*, 1991; Hunter *et al.*, 1997; Paus *et al.*, 1999). Toute une série de substances peuvent interférer avec la myélinisation. Par exemple, des expositions prénatales et postnatales à l'éthanol et au plomb ont provoqué une diminution de la myélinisation des neurones chez le rat et chez l'Homme (Lancaster *et al.*, 1982; Harry *et al.*, 1985; Windebank, 1986; Sundstrom and Karlsson, 1987; Rothenberg *et al.*, 1994; Zoeller *et al.*, 1994; Riley *et al.*, 1995).

Il faut ajouter que tout impact sur la gliogenèse, sur la migration ou la différenciation des oligodendrocytes aura un impact sur la myélinisation, ce qui élargit grandement le champ des molécules qui peuvent altérer la myélinisation des axones.

Apoptose

L'apoptose ou phénomène de mort cellulaire programmée permet pour chaque structure du cerveau de limiter le nombre excédentaire de cellules nerveuses produites lors des phases de

prolifération et d'atteindre ainsi un nombre idéal de cellules interconnectées. L'apoptose intervient à deux moments du développement du cerveau. Au niveau des zones prolifératives et au niveau des cellules post-mitotiques, qui ont déjà un phénotype glial ou neuronal (Blaschke *et al.*, 1996; Blaschke *et al.*, 1998).

Ce phénomène est régulé par les facteurs de croissance, les cytokines et les neurotransmetteurs (Johnson and Deckwerth, 1993).

Certains neurotoxiques environnementaux peuvent interférer lors de périodes critiques avec l'apoptose, modifier le nombre de cellules survivantes et produire des problèmes de fonctionnement. Parmi ces substances, on retrouve l'éthanol (Hoffman and Tabakoff, 1996; Liesi, 1997), le plomb (Oberto *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1997), le méthylmercure (Nagashima, 1997) et certains OP dont le CPF (Roy *et al.*, 1998a).

Régulation des différentes phases.

Il existe une série de molécules régulant la neurogenèse que l'on nomme signaux neurotrophiques. La transduction de ces signaux implique plusieurs messagers, et mène à des modifications de l'expression génique et épigénique par phosphorylation ou glycolysation de signaux déjà existants ou de protéines structurales. Ces modifications sont présentes tant lors de la poussée des processus cellulaires que dans tous les événements qui mènent à la différenciation des neurones (Rice and Barone, 2000).

Une série de molécules morphogéniques interviennent dans les phases de prolifération de différenciation et d'apoptose. Parmi ces molécules, on retrouve des facteurs de croissance et neurotrophines : NGF (nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factors), Neurotrophines 3 et 4, mais aussi les neurotransmetteurs (Cameron *et al.*, 1998) et l'AChE (Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru *et al.*, 1999; Jiang and Zhang, 2008).

Il a été démontré que les neurotransmetteurs interviennent dans chacune des phases du développement du cerveau : ils modulent la prolifération des cellules souches neurales ainsi que l'apoptose, ils régulent la migration et induisent la différenciation des neuroblastes et des glioblastes. Les neurotransmetteurs interviennent également dans la croissance des processus neuronaux, influencent le devenir d'un phénotype particulier, régulent la synaptogenèse et même interviennent dans des mécanismes de plasticité des différentes aires du cerveau en fin de formation du cerveau (réarrangements morpho-fonctionnels) (Emerit *et al.*, 1992; Retz *et*

al., 1996; Levitt *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 2001). Les mécanismes de régulation des différentes phases du développement par les neurotransmetteurs ne sont pas tous élucidés. Certains mécanismes de régulation sont connus et d'autres suggérés. Cependant, les neurotransmetteurs et leurs récepteurs spécifiques apparaissent avant que les synapses soient fonctionnelles et l'activité des récepteurs augmente au moment des différentes phases du développement cellulaire du SNC, ce qui suggère que tous sont impliqués d'une manière ou d'une autre dans la régulation du développement du SNC (Nguyen *et al.*, 2001).

La sérotonine (5HT), l'adénosine, la noradrénaline peuvent stimuler la prolifération cellulaire au cours du développement, alors que l'acétylcholine peut stimuler ou inhiber la prolifération en fonction du récepteur et de la cascade de signaux auquel le récepteur spécifique est lié. Par exemple, la prolifération cellulaire augmente lorsque l'acétylcholine active les récepteurs cholinergiques liés soit négativement^{***} à l'adénylcyclase, soit positivement^{†††} à la phospholipase C. A l'opposé, la prolifération cellulaire est inhibée (et la différenciation activée) lorsque le récepteur cholinergique est lié positivement à l'AMP cyclique (Lauder and Schambra, 1999).

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est un autre neurotransmetteur qui s'avère d'une grande importance dans la régulation des différentes phases du développement cellulaire du cerveau. En effet, par l'activation du récepteur ionotropique GABA_A, GABA contrôle le cycle cellulaire des cellules souches neurales (Sah *et al.*, 1997), inhibe la synthèse d'ADN des cellules progénitrices des neuroblastes (LoTurco *et al.*, 1995) et donc inhibe la prolifération cellulaire. L'activation des récepteurs GABA_A initierait une cascade de signalisation des kinases par un flux entrant de Ca⁺⁺ qui produirait ces effets durant le développement du cerveau (LoTurco *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1997). GABA intervient également dans la phase de migration et de maturation des précurseurs neuronaux en augmentant la motilité des cellules neurales et en favorisant la croissance des processus neuronaux (Behar *et al.*, 1996; Behar *et al.*, 1999; Behar *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001).

Les rôles de régulation du glutamate durant le développement du cerveau sont très complexes. En effet, l'action du glutamate sur la prolifération dépend à la fois du type de récepteur et de la région dans laquelle se présentent ces récepteurs. Le glutamate régule la migration des neuroblastes, la croissance et le nombre des neurites durant la différenciation cellulaire et

*** Un récepteur lié « négativement » à un élément signifie que leur activation inhibe l'activité de cet élément.

††† A l'inverse un récepteur lié « positivement » à un élément signifie que leur activation provoque une activation de cet élément.

interviendrait dans la synaptogenèse. Ce neurotransmetteur aurait également une activité dans la prolifération des glioblastes (Nguyen *et al.*, 2001).

La sérotonine intervient en augmentant la différenciation neuronale et la synaptogenèse via l'activation des récepteurs sérotoninergiques. L'action de ce neurotransmetteur sur le récepteur 5HT₃ s'associerait avec celle de BDNF afin de stimuler la synthèse d'ADN dans les cellules précurseurs des oligodendrocytes (Nguyen *et al.*, 2001).

L'acétylcholine exerce des influences opposées sur la prolifération des processus neuronaux des neuroblastes via l'activation des récepteurs nicotiques en fonction de la région du cerveau et de l'avancement du développement de celui-ci. De plus, l'action de l'acétylcholine sur la mort cellulaire s'oppose à l'action du glutamate au niveau de l'inhibition de l'apoptose, et le résultat diffère en fonction de la zone du cerveau (Nguyen *et al.*, 2001).

La glycine influence (favorise ou inhibe) la croissance des neurites (axones et dendrites) en fonction du type cellulaire, au moins par l'activation de récepteurs spécifiques liés à des canaux à Ca⁺⁺ et aurait une fonction de maturation des cellules gliales myélinisantes (Nguyen *et al.*, 2001).

En conclusion, les rôles des neurotransmetteurs dans la régulation du développement sont très complexes pour plusieurs raisons : chacun paraît intervenir dans différentes phases du développement, l'effet varie en fonction de l'avancement du développement, en fonction des types de récepteurs présents auxquels il se lie, ainsi qu'en fonction de la chaîne de signaux à laquelle le récepteur spécifique est couplé. La régulation du développement se complique un peu plus par une interaction entre l'action des différents neurotransmetteurs et celle des facteurs de croissance.

Si l'AChE est impliquée dans la neurotransmission chez l'adulte par ses fonctions catalytiques (hydrolyse de l'acétylcholine), elle joue également un rôle morphogénique durant le développement du système nerveux : régulation de la prolifération cellulaire, poussée axonale, synaptogenèse et apoptose des cellules nerveuses (Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru *et al.*, 1999; Jiang and Zhang, 2008).

L'AChE est présente durant le début du développement du système nerveux principalement sous une isoforme libre cytoplasmique (AChE-R) et devient principalement membranaire (AChE-S) durant la poussée axonale et juste avant la formation des synapses nerveuses matures du SNC (Layer and Willbold, 1994; Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru *et al.*, 1999). C'est cette forme S qui, en se liant à d'autres facteurs trophiques, participe à la

régulation de la prolifération cellulaire, mais aussi au phénomène d'apoptose. Les mécanismes exacts de régulation sont encore à élucider. Néanmoins l'équilibre entre la présence de ces différentes isoformes S et R et la transition vers la forme R jouerait un rôle crucial dans la régulation du développement du SNC (Jiang and Zhang, 2008).

Un signe du rôle morphogénique de l'AChE est son apparition transitoire au moment de la connexion synaptique, et ceci même au niveau des neurones non cholinergiques chez le rat (Robertson, 1987; Brimijoin and Hammond, 1996) comme chez l'Homme (Kostovic and Goldman-Rakic, 1983). Un autre signe de son rôle morphogénique est que l'AChE-S possède des domaines impliqués dans le rôle d'adhésion de protéines membranaires. Ces domaines ont une grande proportion d'homologie (environ 60%) avec d'autres protéines transmembranaires morphogéniques non catalytiques de famille des neurexines (Nguyen and Sudhof, 1997) et seraient responsables de la régulation de la poussée des processus neuronaux (Brimijoin and Koenigsberger, 1999; Grisaru *et al.*, 1999).

Il existe une autre cholinestérase que l'on retrouve chez l'adulte principalement dans le foie, les poumons, le plasma et la glie et paraît y jouer des fonctions catalytiques moins importantes que l'AChE : la butyrylcholinestérase (BuChE). Layer et collaborateurs ont montré à l'aide de leur modèle oiseau (poule) que durant le développement du cerveau, les neuroblastes expriment intensément la BuChE tant qu'ils se divisent, et que par contre, ils commencent à exprimer l'AChE dès qu'ils cessent de se diviser et qu'ils commencent à développer des processus axonaux. Cela suggère que ces deux molécules joueraient des rôles opposés dans la prolifération cellulaire et régulation des processus axonaux (Layer and Sporns, 1987; Layer, 1990a; Layer, 1990b; Weikert *et al.*, 1990; Layer and Willbold, 1994; Layer and Willbold, 1995). Le même genre de phénomène dans lequel une expression transitoire de la BuChE et de l'AChE-S survient durant le développement du système nerveux chez le rat (Koenigsberger *et al.*, 1998).

Plus récemment, Slotkin et collaborateurs ont montré que le rôle morphogénique de l'AChE, non-enzymatique, est étroitement lié au système catécholaminergique. En effet, un inhibiteur spécifique catécholaminergique détruisant les terminaisons nerveuses catécholaminergiques empêche l'AChE de jouer son rôle morphogénique qui favorise normalement la poussée des processus neuronaux cholinergiques chez les rats nouveau-nés (Slotkin *et al.*, 2009).

Mise en place des récepteurs au cours du développement du cerveau.

Les récepteurs cholinergiques apparaissent progressivement au cours du temps selon un gradient caudo-ventral dans les différentes grandes structures du cerveau. Chez le rat, les récepteurs nicotiniques se présentent d'abord dans la moelle épinière (GD 12) et ensuite dans les régions plus antérieures comme le mésencéphale et diencéphale (GD 14) pour enfin survenir dans le néocortex en fin de gestation (GD 18). Les récepteurs muscariniques apparaissent également avec un décalage dans les différentes structures du cerveau : dans la moelle épinière et le bulbe rachidien (GD 16) ; dans le plateau cortical (GD 18) et dans le néocortex (GD22). Les neurones cholinergiques ont déjà migré vers le cortex en fin de gestation mais l'innervation cholinergique (synaptogenèse) du cortex ne se réalise qu'après la naissance. Les récepteurs muscariniques cholinergiques seraient impliqués dans la croissance axonale et dans des réarrangements cellulaires durant la morphogenèse du cortex (Lauder and Schambra, 1999).

1.4.3 ÉTUDE DE LA NEUROTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DES INSECTICIDES ORGANOPHOSPHORÉS.

Nous allons décrire ici les effets neurodéveloppementaux des OP ainsi que les mécanismes élucidés et suggérés à l'origine de l'obtention de ces problèmes. Nous regroupons volontairement les données issues des études épidémiologiques chez l'Homme, puis celles provenant des études de modèles animaux *in vivo* et des études *in vitro*. En dernier lieu, nous expliquerons les effets mis en évidence par des études neurocomportementales qui seront notre outil de travail.

1.4.3.1 Etudes épidémiologiques et effets neurocomportementaux chez l'Homme.

Concernant la neurotoxicité développementale des OP, des études épidémiologiques récentes ont pu mettre le doigt sur des périodes sensibles durant la grossesse (périodes prénatales) ou au début de la vie (périodes néonatales ou postnatales) (Ruckart *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2005; Rauh *et al.*, 2006; Engel *et al.*, 2007; Eskenazi *et al.*, 2007).

Chez l'Homme, la neurotoxicité développementale des OP produite par des doses de CPF n'impliquant qu'une faible inhibition du système cholinergique a été suggérée par une série d'études épidémiologiques. Parmi ces études, certaines comparent des populations exposées aux OP à d'autres populations qui ne le seraient pas.

Par exemple, une de ces études décèle un plus grand nombre de problèmes neurodéveloppementaux chez des enfants de 4 et 5 ans dans une communauté d'agriculteurs Mexicains exposés aux OP comparé aux enfants appartenant à une autre communauté très proche mais non exposée aux OP. La comparaison est intéressante puisque les deux populations ont des origines génétiques, des conditions de vie, des valeurs culturelles et sociales, une alimentation et des comportements similaires. La raison est que toutes deux sont issues de la même communauté au départ et se sont séparées récemment. En effet, l'une est restée sur place et a formé une communauté d'agriculteurs utilisant des OP, alors que l'autre population a migré un peu plus loin en ville. La seule différence entre les deux populations serait le degré d'exposition aux pesticides, mesuré à des taux élevés quelques années plus tôt (en 1990) dans le sang ombilical et dans le lait maternel dans la communauté d'agriculteurs. Des problèmes de mémoire à court terme, de coordination des yeux et des mains, de résistance mentale, de capacité à dessiner ont été mis en évidence en plus grande occurrence dans la communauté d'agriculteurs (Guillette *et al.*, 1998). Cependant, même si les résultats furent intéressants, quelques défauts dans le protocole de ces études - comme l'absence de marqueurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition de chaque individu, l'absence d'évaluation à l'aveugle et de l'utilisation de tests psychologiques reconnus - limitent la validité du lien de cause à effet entre exposition prénatale aux OP et les troubles détectés chez l'adulte (Rauh *et al.*, 2006). De plus d'autres insecticides utilisés par ces agriculteurs, comme les organochlorés, peuvent également avoir une responsabilité dans les problèmes neurodéveloppementaux détectés. Donc, ces études ne permettent que de suggérer la production de neurotoxicité développementale du CPF.

Un lien a été mis en évidence entre la réduction de la circonférence de la tête chez des enfants et l'activité de l'enzyme PON1. Rappelons que cette enzyme qui métabolise le CPO en TCP, permet de détoxifier le CPF avant qu'il ait pu inhiber l'AChE (Berkowitz *et al.*, 2004).

D'autres études épidémiologiques ont mis en relation des problèmes neurodéveloppementaux avec l'exposition prénatale aux OP, qui cette fois est évaluée pour chaque individu. Ci-dessous sont décrites quelques unes de ces études.

L'une d'entre-elles a mis en liaison le niveau de présence de métabolites d'OP chez la mère et des troubles neurodéveloppementaux chez leur enfant âgé de 3 à 62 jours : troubles de l'habituation et de l'orientation, diminution de performance motrice, manque de stabilité autonome et réflexes anormaux (Young *et al.*, 2005).

Une autre étude épidémiologique, réalisée sur 254 enfants nés en 1998 à New-York, a comparé le développement cognitif et moteur par des tests et questionnaires type⁺⁺⁺ et le comportement^{§§§} chez des enfants de 3 ans. Ces scores ont été mis en rapport avec le niveau d'exposition prénatal au CPF, évalué par le taux de cet insecticide et de ses métabolites dans le plasma du cordon ombilical. Les mères volontaires ont été choisies en fonction du respect d'un grand nombre de critères (âge, ethnie, statut marital et social, éducation, statut médical, etc...), afin de limiter les différences entre familles non liées à l'exposition au CPF. Les résultats de cette étude ont montré que les enfants fortement exposés prénatalement au CPF (> 6.17 pg/g plasma) ont à l'âge de 3 ans un index (*de Bayley*) de développement psychomoteur et mental plus bas que les enfants moins exposés. A cette diminution d'index s'ajoute notamment des problèmes d'attention et de l'hyperactivité. L'étude a mis également en évidence une plus grande proportion d'enfants ayant un retard psychomoteur (5 fois) et mental (2,4 fois) chez les plus exposés par rapport au moins exposés au CPF (Rauh *et al.*, 2006).

Plus récemment, les résultats d'une étude concernant des enfants et leurs mères appartenant à une communauté d'agriculteurs Californiens, suggèrent premièrement un lien entre exposition *in utero* aux pesticides organophosphorés et des réflexes anormaux chez les nouveau-nés, et deuxièmement une influence négative sur le développement des enfants plus vieux (Rosas and Eskenazi, 2008). Une précision est apportée par Eskenazi et collaborateurs : l'association entre exposition prénatale aux OP et des troubles du développement mental persistants chez des enfants de deux ans (Eskenazi *et al.*, 2008).

Ces études épidémiologiques étant récentes, il faudra attendre encore quelques années pour savoir si les troubles neurodéveloppementaux décelés chez de jeunes enfants périnatalement exposés à des doses connues d'OP persistent à des âges plus avancés. En attendant, l'étude des effets développementaux des OP par des modèles animaux peut donner une idée des risques encourus. De plus, si ces études *in vivo* sont associées à des recherches *in vitro*, elles peuvent apporter des renseignements utiles à la compréhension des mécanismes impliqués dans ces phénomènes développementaux.

⁺⁺⁺ « *Bayley Scales of infant Development II* » : questionnaire basé sur l'observation de l'interaction mère enfant (Bayley, 1993)

^{§§§} Le comportement est mesuré par le « *Child Behaviour Checklist* » (Achenbach, 1991).

1.4.3.2 Modèles animaux et mécanismes impliqués dans la toxicité développementale des insecticides organophosphorés (CPF)

Nous avons expliqué plus haut que la première cible des OP était l'AChE. C'est la raison pour laquelle des chercheurs ont tenté de déterminer si l'inhibition de cette enzyme était impliquée dans les phénomènes de toxicité développementale provoquée par les OP.

Pour tenter de répondre à cette question, les chercheurs se sont donc d'abord intéressés aux différences de sensibilité de l'AChE aux OP entre adultes et sujets en développement. Dans ce cadre, une étude d'exposition au CPF à dose aiguë a montré que les rats nouveau-nés étaient plus sensibles à la toxicité systémique que les adultes. Cela suggère que la toxicité développementale pourrait avoir comme origine une grande sensibilité à l'AChE des jeunes individus (Pope *et al.*, 1991; Pope and Chakraborti, 1992; Pope *et al.*, 1992; Whitney *et al.*, 1995). Par contre, la récupération à l'inhibition de l'AChE est plus rapide chez les jeunes que chez les adultes, probablement parce que la synthèse de nouvelles molécules d'AChE se fait plus rapidement chez les jeunes individus (Pope *et al.*, 1991; Pope *et al.*, 1992; Song *et al.*, 1997). Cette propriété de récupération plus rapide devrait protéger les jeunes animaux de la toxicité développementale si elle était uniquement liée à l'inhibition de l'AChE (Lassiter *et al.*, 1998). Toutefois, les jeunes restent plus sensibles à la toxicité du CPF en doses aiguës. La conclusion est que d'autres mécanismes que l'inhibition de l'AChE doivent être impliqués dans la toxicité du CPF chez les sujets en développement.

Il existe en réalité une série de sites, de mécanismes avec lesquels le CPF peut interagir et ceci à différents moments du développement, allant de la formation du tube neural jusqu'à l'adolescence. Des études *in vitro* et *in vivo* ont pu révéler certains de ces mécanismes qui touchent directement ou indirectement le développement et la survie des neurones du SNC. Nous avons regroupé ces expériences ci-dessous.

Des preuves de toxicité du CPF envers les cellules nerveuses ont été montrées dans de nombreuses expériences, et à divers moments du développement du cerveau. Dans ce cadre, des études d'embryons de rat en culture exposés une journée au CPF (0,5-50 µg/ml) (Roy *et al.*, 1998a) durant le moment de la formation du tube neural (première semaine de gestation chez le rat) ont montré l'apparition d'anomalies mitotiques ainsi que des figures d'apoptose dans le cerveau après 48 heures. Slotkin (Slotkin, 2004) estime ces problèmes très semblables à ceux produits par la nicotine dans les mêmes conditions d'exposition (Roy *et al.*, 1998b). En considérant que la nicotine crée ces problèmes en agissant directement sur les récepteurs nicotiques, on pourrait penser que le CPF agirait de la même façon. Néanmoins, dans le cas

du CPF, la stimulation des récepteurs nicotiques ne peut se faire que lors de la libération active d'ACh. Or, il semblerait que le système de synthèse (choline acétyltransférase) de ce neurotransmetteur ne soit pas encore existant à ce stage du développement (Lauder and Schambra, 1999). Ces effets néfastes sur le cerveau en développement ne seraient donc pas liés directement à l'inhibition de l'AChE.

D'autres expériences d'exposition au CPF, réalisées également durant le moment de la formation du tube neural, ont confirmé des dommages prodigués aux neurones. Ces dommages, parfois subtils et difficiles à mettre en évidence au moment de l'exposition peuvent resurgir plus tard dans la vie adulte (Qiao *et al.*, 2004).

Dans le même ordre d'idée, il a été montré que des altérations cellulaires produites par le CPF durant la fin de la gestation, soit des déficits dans le nombre de cellules, diminution du nombre de projections neuronales et du nombre de synapses, disparaissent assez rapidement (Qiao *et al.*, 2002), pour réapparaître plus tard durant l'adolescence et la vie adulte, accompagnées de divers problèmes neurocomportementaux (Garcia *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2003). Les zones du cerveau touchées sont riches en projections cholinergiques, comme l'hippocampe et le cortex frontal.

Dans les deux cas (exposition en début ou fin de gestation) les doses employées étaient sous le seuil de détection d'inhibition de l'AChE du cerveau ou de toxicité systémique.

Il a été montré que la synthèse d'ADN est fortement ralentie par une exposition au CPF durant le premier jour de vie, qu'il soit introduit via la circulation (ce qui permet sa bioactivation en CPO) ou directement dans le cerveau (CPF non-transformé) (Whitney *et al.*, 1995). Dans ces conditions d'exposition, il n'est pas observé de sélectivité dans le type de zone touchée : riche ou non en récepteurs cholinergiques nicotiques. Il s'agirait d'une altération de la phase de prolifération cellulaire. La sélectivité débute seulement à la fin de la première semaine postnatale, lors de la phase de synaptogenèse cholinergique. Cela suggère à nouveau que les mécanismes impliqués dans la toxicité développementale du CPF sont dans un premier temps médiés par des mécanismes indépendants de l'inhibition de l'AChE et ensuite médiés via une hyperactivité cholinergique.

L'utilisation des cellules PC12 a permis de mettre en évidence la capacité du CPF à inhiber la synthèse d'ADN indépendamment de l'activation cholinergique. En effet, l'inhibition survient avant que les cellules présentent les caractères cholinergiques fonctionnels. Aussi, une fois

qu'il est permis à ces cellules de se différencier, par la présence de facteurs de croissance, le phénomène d'inhibition du CPF s'accroît et persiste, interférant avec la différenciation cellulaire (Song *et al.*, 1998). Il y a également une inhibition de la croissance des processus neuronaux (neurites) (Das and Barone, 1999).

Il s'agirait d'une interférence (de type non-cholinergique) entre le CPF et des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire (Song *et al.*, 1998; Crumpton *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001). Les mécanismes non-cholinergiques impliqués feraient partie des cascades de signaux, communes à de nombreuses entrées neuronales, telles que la cascade adénylcyclase-AMPcyclophosphate-protéine kinase A et que la cascade de signaux récepteurs utilisant la kinase C (Bomser *et al.*, 2002; Yanai *et al.*, 2002). Il y aurait un effet direct du CPF sur l'expression et la fonction de certains facteurs de transcription régulant le passage entre la réplication et la différenciation, ainsi que la croissance des processus neuronaux : C-fos, p53, AP-1, Sp1, CREB (*Ca⁺⁺/cAMP Response Element binding Protein*) (Crumpton *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001; Schuh *et al.*, 2002; Dam *et al.*, 2003).

Il est important de préciser que ces modifications d'activités, en particulier du facteur de transcription CREB, interviennent à un niveau d'exposition très bas, bien en dessous du niveau typique d'exposition de l'Homme ou sous le seuil de détection d'inhibition de l'AChE. De plus, cet effet n'est pas dû à son métabolite actif (CPO) mais bien au CPF lui-même (Schuh *et al.*, 2002).

Jameson et collaborateurs (Jameson *et al.*, 2006) ont montré *in vitro* et *in vivo* que le CPF peut influencer la différenciation des précurseurs neuronaux vers différents phénotypes en fonction du moment auquel se déroule l'exposition, ou en d'autres termes en fonction de l'avancement de différenciation cellulaire. En effet, *in vitro*, une exposition au CPF (sur des cellules PC12 utilisées comme modèle de différenciation neuronale) diminue l'occurrence du phénotype cholinergique alors qu'une exposition au milieu de différenciation augmente l'expression du phénotype catécholinergique. *In vivo*, des déficits du nombre de neurones cholinergiques lors d'une exposition au CPF sont observés également.

Les travaux de l'équipe de Slotkin ont permis de déterminer *in vivo* et *in vitro* que la différenciation cellulaire peut être altérée par une exposition à des OP (CPF et diazinon) en dose subtoxique (sous le seuil de détection d'inhibition de l'AChE et ne produisant pas de symptômes d'empoisonnement systémique) par une action directe sur certains facteurs neurotrophiques, par leurs récepteurs ainsi que la cascade de signaux gouvernant la

différenciation cellulaire. Certains facteurs neurotrophiques (BDNF : *brain derived growth factors*, NGF : *nerve growth factor*, et FGFs : *fibroblast growth factor family*) et leurs récepteurs seraient donc également des cibles du CPF pour la toxicité développementale. L'altération de l'un ou l'autre de ces facteurs, en fonction du niveau d'exposition et de la période d'exposition aux OP serait à l'origine de problèmes neurocomportementaux particuliers (Slotkin *et al.*, 2007b; Slotkin *et al.*, 2008d).

Une fonction non enzymatique de l'AChE est son implication dans la morphogénèse des processus nerveux (Brimijoin and Koenigsberger, 1999). Le CPF et le CPO inhibent *in vitro* la croissance axonale à des doses ne produisant pas d'inhibition significative d'activité de l'AChE (Howard *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Le CPF induirait cet effet par une altération de la fonction non enzymatique, morphogénique de l'AChE (Yang *et al.*, 2008). Cette altération se ferait par liaison à un site anionique de l'AChE, impliqué dans les interactions entre cette protéine et celles des processus axonaux, nécessaires à la croissance de ceux-ci. (De Ferrari *et al.*, 2001; Kousba *et al.*, 2004; Rosenfeld and Sultatos, 2006). La liaison au site actif de l'AChE (serine 203) (par le CPO sans doute) influencerait la conformation tridimensionnelle de cette enzyme afin de rendre non-fonctionnel l'autre site impliqué dans la morphogénèse et situé relativement près de ce site actif. Dans ce cas, l'effet serait donc indirect (Milesion *et al.*, 1998).

Des études comportementales chez le rat ont montré que la période de sensibilité du cerveau en développement ne s'arrête pas à la gestation et à la première semaine du développement, périodes durant lesquelles se déroule la neurogenèse. En effet, cette période se prolonge durant la deuxième et troisième semaine de vie des rongeurs par l'occurrence des pics de gliogénèse et de synaptogénèse (Moser *et al.*, 1998; Moser and Padilla, 1998; Dam *et al.*, 2000; Moser, 2000; Levin *et al.*, 2001).

Nous savons que la glie joue, par ses rôles de nutrition, support et protection des cellules neurales, un rôle essentiel dans l'élaboration et la maintenance de l'architecture du cerveau, nécessaire à son bon fonctionnement (Barone *et al.*, 2000). Toute perturbation de la gliogénèse pourrait donc avoir des conséquences sur l'élaboration et la fonctionnalité du SNC. En l'occurrence, il a été montré *in vivo* que le CPF inhibe la synthèse d'ADN et crée des pertes cellulaires importantes durant le développement des cellules gliales (Campbell *et al.*, 1997; Slotkin, 1999; Monnet-Tschudi *et al.*, 2000). Des études *in vitro* utilisant des marqueurs spécifiques des cellules gliales ont démontré que le CPF s'attaquait directement à ces cellules

et sans inhibition mesurable de l'AChE du cerveau (Monnet-Tschudi *et al.*, 2000). Aussi le CPF ciblerait préférentiellement les cellules gliales (versus cellules neuronales) (Garcia *et al.*, 2002). D'autres auteurs précisent que c'est le CPF et moins le CPO ont un effet plus fort sur la glie que sur les neurones en développement (inhibition de la synthèse de l'ADN) (Qiao *et al.*, 2001).

L'administration *in vivo* par voie sous-cutanée (s.c.) de 5 mg/kg.jour de CPF (dose subtoxique) durant la gliogenèse (PND 11-14) chez le rat produit des effets qui surviennent à l'adolescence, comme une diminution du nombre de cellules neuronales et gliales dans certaines régions du cerveau, mais surtout au niveau de l'hippocampe et avec un effet plus marqué envers les cellules gliales. La structure même et la répartition des différentes couches de l'hippocampe s'en trouvent altérées (Roy *et al.*, 2005).

Une étude *in vitro* à partir de cultures d'astrocytes de fœtus de rat et d'une lignée astrocytaire humaine (1321N1) a précisé les effets de trois OP et de leurs métabolites actifs (oxon) et inactifs : le CPF, le diazinon et le parathion inhibent la prolifération des cellules gliales de la même manière que leurs métabolites actifs (CPO, diazoxon et paraoxon) alors que leurs métabolites inactifs (3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP), 2-isopropyl-6-méthyl-4-pyrimidol (IMP) et para-nitrophénol) ont une action moins intense (Guizzetti *et al.*, 2005).

Le CPF influencerait la synaptogenèse de manière indirecte. En effet, une dose de CPF un peu plus élevée que celle mesurée chez l'Homme (50µg/mL), induit *in vitro* une libération de norépinephrine par les synaptosomes du cerveau de rat (Dam *et al.*, 1999). Cette induction de libération de norépinephrine par le CPF ainsi que l'inhibition de la synaptogenèse ont été confirmées *in vivo* chez le rat durant le développement. Cette inhibition de la synaptogenèse est persistante puisqu'elle subsiste durant la vie adulte lorsque le niveau d'activité d'AChE est restauré (Levin *et al.*, 2002).

Le système cholinergique et noradrénergique ne sont pas les seuls à être touchés par le CPF durant le développement du cerveau. En effet, l'évolution et l'équilibre du système sérotoninergique du SNC en développement est également perturbé par le CPF. Des études *in vivo* réalisées par Aldridge et collaborateurs (Aldridge *et al.*, 2004) ou Slotkin et Seidler (Slotkin and Seidler, 2007c) ont révélé des perturbations du système sérotoninergique conséquentes à l'exposition au CPF durant différents moments du développement du cerveau. Par exemple, une administration de CPF durant le milieu de la gestation (GD9-12) uprégule

les récepteurs à sérotonine (5 hydroxytryptamine : 5TH) de type 5HT_{1A} et 5HT₂. Dans ce cas d'exposition, s'ajoute à ces perturbations une interférence entre le CPF et la protéine transporteuse de la 5HT. Cette interférence débute lors de la formation du tube neural et semble persister jusqu'à la vie adulte. Autre exemple, si le traitement au CPF est appliqué en fin de gestation (GD 17-20), les effets sur le nombre de récepteurs et transporteurs sérotoninergiques sont similaires (sur-régulation), mais surviennent dans les régions du cerveau riches en terminaisons sérotoninergiques. Pour cette période d'exposition, les effets sérotoninergiques ne sont observés que chez le mâle. Troisième exemple, pour une période d'exposition au CPF juste après la naissance (PND 1-4), ces altérations du système sérotoninergique ont toujours lieu (augmentation du nombre de récepteurs sérotoninergiques), mais avec une sous-régulation des protéines transporteuses de 5HT.

Le même genre d'étude d'exposition durant les quatre premiers jours de vie chez le rat (PND 1-4) mais avec d'autres OP comme le diazinon et le parathion ont confirmé des altérations du système sérotoninergique. Cependant, ces effets diffèrent d'un OP à l'autre (sur-régulation ou sous-régulation de récepteurs 5HT_{1A} et 5HT₂ en fonction de la région du cerveau et du type d'OP) (Slotkin *et al.*, 2006).

Nous verrons plus loin (voir chapitre 1.4.3.3) que ces altérations du système sérotoninergique, conséquentes à une exposition au CPF durant le développement du cerveau ont été mises en relation avec des problèmes neurocomportementaux (troubles de l'humeur, affectifs et sociaux), mesurés chez l'adulte (Aldridge *et al.*, 2005a; Aldridge *et al.*, 2005b). Toutes ces études furent réalisées avec des doses sous le seuil d'inhibition de l'AChE qui permettrait l'apparition de symptômes observables de toxicité systémique.

Les effets du CPF sur le système sérotoninergique durant la différenciation neuronale des cellules PC12 nerveuses ont été mis en évidence très récemment par l'équipe de Slotkin et Seidler *in vitro*. Il semblerait que le CPF (30 µM), sans produire de toxicité cellulaire, inhibe l'activité du tryptophane hydroxylase, l'enzyme limitant la synthèse de la 5TH, diminue l'expression des gènes codant pour les protéines transporteuses de sérotonine (deux phénomènes qui augmentent la concentration extracellulaire en sérotonine) et augmente l'expression des récepteurs à sérotonine. Nous devons faire remarquer que d'autres OP comme le diazinon, perturbent également le système sérotoninergique mais pas toujours de la même façon. En effet, dans cette expérience, le diazinon produit également une augmentation de la sérotonine extracellulaire, mais au contraire du CPF, il tend à diminuer le nombre de récepteurs sérotoninergiques (Slotkin and Seidler, 2008b).

En conclusion, les OP et en particulier le CPF sont susceptibles, même en doses inférieures au seuil de toxicité, d'altérer tout un grand nombre de mécanismes impliqués dans la régulation des différentes phases du développement du cerveau. Le CPF peut interférer avec la prolifération, la migration, la différenciation des précurseurs neuronaux et avec la synaptogenèse, en interagissant avec les facteurs morphogéniques : des facteurs de croissance, de nombreux neurotransmetteurs et leurs récepteurs spécifiques (via l'altération des cascades de signaux postsynaptiques qu'ils ont en commun), l'AChE dans son rôle morphogénique et dans l'apoptose, mais aussi en interagissant avec une série de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire.

1.4.3.3 Les études neurocomportementales

Le développement du système nerveux des rongeurs offre de nombreuses similitudes avec celui de l'Homme, tant dans la manière dont les structures sont mises en place que dans la chronologie des événements (Rodier, 1980; Bayer *et al.*, 1993; Costa *et al.*, 2004). De cette manière il fournit un outil utile pour étudier les effets développementaux du CPF suggérés chez l'Homme par des études épidémiologiques. En effet, même dans les meilleures conditions, la relation de cause à effet est souvent difficile à démontrer par des études épidémiologiques chez l'Homme, car de nombreux autres facteurs difficiles à mesurer peuvent également venir perturber le développement. Aussi, les modèles d'études comportementales offrent la possibilité de prédire d'éventuels effets développementaux chez l'Homme.

Les études comportementales de modèles animaux sont d'une grande importance car elles permettent de détecter des formes de toxicité développementale que les modèles *in vitro* et moléculaires *in vivo* laissent inaperçues. En effet, la complexité organisationnelle et fonctionnelle des cellules du système nerveux central requise pour l'élaboration des comportements permet à de petites altérations de cette organisation d'être détectées par des tests neurocomportementaux, alors qu'elles peuvent passer inaperçues par des techniques de mesure moléculaires ou histologiques. De plus, au vu de la variété des mécanismes touchés par le CPF et par ses métabolites lors du développement du cerveau, il est difficile de prévoir l'effet synergique de ceux-ci.

Nous avons rassemblé ci-dessous les résultats des études dans lesquelles une exposition au CPF a produit des altérations comportementales persistantes (voir aussi tableau 1.1 ; p 48).

Effets sur l'activité locomotrice spontanée.

Une exposition subtoxique de CPF (1 ou 5 mg/kg.jour) durant le milieu de la gestation (GD9-12) (Icenogle *et al.*, 2004) ou en fin de gestation (GD 17-20) (Levin *et al.*, 2002), produit une hyperactivité dans des tests comportementaux réalisés chez le rat adulte (labyrinthe en T, le labyrinthe en croix surélevé). Toutefois, cette hyperactivité ne survient que durant la partie initiale de ces tests.

Les animaux exposés prénatalement au CPF présentent une diminution de l'habituation (et de l'activité locomotrice spontanée) dans le labyrinthe en 8 (durant sur 60 minutes). Cette diminution de l'habituation est présente chez les sujets des deux sexes pour la période d'exposition au milieu de gestation et s'accompagne d'une hypoactivité générale (Icenogle *et al.*, 2004) alors qu'elle n'est perturbée que chez les rats femelles dans le cas d'une exposition au CPF en fin de gestation (Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004).

En ce qui concerne l'exposition postnatale, l'exposition subtoxique au CPF (1 mg/kg.jour s.c.) de rats nouveau-nés (PND 1-4) produit à l'adolescence une hypoactivité dans le labyrinthe en 8, mais uniquement chez le rat mâle alors qu'aucune altération du niveau d'activité locomotrice n'a pu être mise en évidence pour une exposition plus tardive (PND 11-14) (Dam *et al.*, 2000).

Chez la souris, une exposition de 6 mg/kg.jour de CPF (mais pas 3 mg/kg) durant la fin de gestation (exposition orale de la mère GD 15-18), comme un traitement postnatal de 3 mg/kg.jour (et pas 1 mg/jour) en début de vie (PND 1-4) ou un peu plus tard dans le développement du cerveau (PND 11-14), produit à l'âge adulte une augmentation de l'activité locomotrice spontanée (hyperactivité) dans un espace ouvert (Ricceri *et al.*, 2003; Ricceri *et al.*, 2006). Ricceri et collaborateurs précisent que cette hyperactivité, conséquence à une exposition prénatale ou postnatale au CPF, peut disparaître lorsque le traitement est administré durant les deux périodes, en tout cas pour les plus fortes doses d'exposition postnatale de CPF utilisées (3 mg/kg) (Ricceri *et al.*, 2006).

Les altérations de l'activité locomotrice provoquées par le CPF s'avèrent de nouveau mettre en œuvre plusieurs mécanismes qui surviennent à différents moments du développement. A partir de la fin de la gestation, ces moments particuliers périnataux représentent des périodes critiques qui sont différentes chez les animaux des deux sexes.

Nous devons remarquer que les doses de CPF nécessaires à l'altération de l'activité sont plus hautes pour les périodes d'exposition postnatales que prénatales.

Effets cognitifs : effets développementaux du CPF sur la mémoire et l'apprentissage.

Chez les rongeurs, c'est l'altération de la mémoire spatiale par le CPF qui a été étudiée. Des précisions sont parfois apportées, si le test le permet, quant au type de mémoire spatiale touchée. Par exemple, une différenciation est faite quant aux effets du CPF sur la mémoire de référence et de travail.

Chez le rat, les mémoires de référence et de travail, mesurées à l'âge adulte (dans un labyrinthe radial à 16 bras), sont altérées pour les animaux des deux sexes si la période d'exposition au CPF (1 mg/kg.jour) se déroule au milieu de la gestation (GD9-12) (Icenogle *et al.*, 2004) alors que seules les femelles montrent une altération de la mémoire lorsque l'exposition prénatale au CPF (1 mg/kg.jour s.c.) se passe en fin de gestation (GD 17-20) (Levin *et al.*, 2002). Une exposition subtoxique postnatale au CPF (1 mg/kg.jour, s.c., PND 1-4) produit des effets opposés en fonction du sexe sur la mémoire mesurée chez des rats adultes dans un labyrinthe radial à 16 bras. En effet, les rats mâles exposés montrent une altération de leur mémoire de référence et de travail alors que les rats femelles présentent une légère amélioration de ces deux types de mémoire. Les effets opposés sont tels que les rats femelles exposées atteignent le même niveau que les rats mâles, qui dans les conditions normales (contrôles) atteignent des performances plus élevées que les rats femelles (Levin *et al.*, 2001; Aldridge *et al.*, 2005a). Dans cette expérience, il serait sans doute plus juste de dire que la qualité de la mémoire des rats mâles exposés au CPF diminue jusqu'au niveau de celle des femelles car l'amélioration de la qualité de la mémoire des femelles est très faible.

Aldridge et collaborateurs associent les problèmes d'apprentissage des rats mâles exposés au CPF à une altération du système sérotoninergique. En effet, l'utilisation d'un antagoniste spécifique du récepteur sérotoninergique 5HT₂ (la kétensérine) affecte l'apprentissage des mâles exposés, ce qui est anormal et ne survient pas chez les mâles contrôles. Par cet effet, les auteurs démontrent une augmentation de l'utilisation de cette voie sérotoninergique dans l'apprentissage chez les animaux exposés. Ces modifications du système sérotoninergique montrent que le CPF est capable de modifier la circuiterie du cerveau, ce qui pourrait participer à l'induction de troubles de la mémoire chez l'adulte, mais aussi des troubles de l'humeur, dans lequel le système sérotoninergique joue un rôle modulateur (Aldridge *et al.*, 2005a).

En conclusion, le CPF (en doses journalières subtoxiques) est capable de produire des troubles de la mémoire spatiale chez les rongeurs. Quatre jours d'exposition durant la gestation ou durant les premiers jours de la vie postnatale peuvent suffire à produire ces effets comportementaux. Le fait que ces altérations touchent les rongeurs de sexe mâle ou femelle paraît lié à la période d'exposition.

Effets sur l'état d'anxiété.

Avant de décrire les effets développementaux du CPF sur le niveau d'anxiété dans les modèles animaux, il nous semble opportun de rappeler ce qu'est l'anxiété. Dans un cadre non-pathologique, l'anxiété est un état de préparation cognitif et comportemental qu'un organisme mobilise en réponse à une menace potentielle distante dans l'espace ou le temps. On parle alors d'état d'anxiété comme une réponse adaptative de grande vigilance qui permet à l'organisme de naviguer dans un environnement inconnu dans lequel un danger ou un stress est ressenti. Dans sa forme pathologique, l'anxiété est un état de mauvaise adaptation qui empêche l'organisme à répondre adéquatement à son environnement (Leonardo and Hen, 2008).

Quelques tests comportementaux ont été mis au point afin de mesurer l'anxiété chez les rongeurs (rat et souris). Ces tests permettent l'analyse de la réponse de l'animal à une source anxiogène spécifique à l'espèce, et qui en général comporte un caractère spatial (grand espace ouvert, plateau surélevé, lumière) et implique la peur. Cet état émotionnel se traduit par des réponses d'évitement, de fuite et d'anxiété. L'appareil de test comporte donc également un espace non anxiogène qui permet aux animaux de se soustraire à la source anxiogène.

Une particularité des rongeurs est qu'ils possèdent un comportement d'exploration très développé, qui les pousse à revenir vers la source de la peur. Dans ces appareils de mesure d'anxiété, le contraste entre les deux espaces (anxiogène et non anxiogène) est suffisamment marqué pour produire un état dynamique de l'animal et l'occurrence de réponses d'approche et de fuite de la source de peur, spécifiques à l'anxiété. L'analyse et la mesure de ces réponses à l'aide de critères spécifiques permet d'évaluer l'état d'anxiété de l'animal (Ennaceur *et al.*, 2006a; Ennaceur *et al.*, 2006b). Parmi les appareils de mesure de l'anxiété, il y a le labyrinthe en croix surélevé (« *Elevated Plus Maze* », EPM) et le test des chambres claires et sombres (« *Light and dark box test* »). Ces deux tests d'anxiété sont décrits dans le matériel et méthode du chapitre 2.3.3.3.

Ci-dessous, nous avons rassemblé les données issues des études de l'altération persistante de l'anxiété par une exposition subtoxique périnatale au CPF chez le rat et la souris.

Par un test de 5 minutes dans le labyrinthe en croix surélevé, l'équipe d'Aldridge a pu mettre montrer une diminution du niveau d'anxiété (augmentation du temps passé dans les bras ouverts) chez les rats adultes qui avaient été traités postnatalement (PND 1-4) à 1 mg/kg.jour de CPF. Cet effet n'est survenu que chez les rats adultes de sexe mâle (Aldridge *et al.*, 2005a). Les effets développementaux du CPF sur l'anxiété des souris adultes ont été mesurés dans EPM dans les travaux de l'équipe de Ricceri pour une période d'exposition prénatale en fin de gestation (GD 15-18, voie orale) ou postnatale tardive (PND 11-14 ; s.c.). Selon Ricceri et collaborateurs, une diminution du niveau d'anxiété survient à l'âge adulte chez les deux sexes, que l'exposition soit prénatale ou postnatale. Cependant, l'effet anxiolytique est plus intense chez la souris femelle et en conséquence à l'exposition postnatale (Ricceri *et al.*, 2006).

Test comportemental	Animal	dose mg/kg.jour	Route et véhicule	Période d'exposition	Age durant le test	Sexe	Effets développementaux	références
Mémoire et apprentissage	Labyrinthe radial à 16 bras	1 (5)	s.c./DMSO	GD9-12	PND 56-91	m,f	↓ mémoire référence et travail (phase initiale)	(Icenogle <i>et al.</i> , 2004)
	Labyrinthe radial à 16 bras	1 (5)	s.c./DMSO	GD 17-20	PND 56-91	f	↓ mémoire de référence et travail	(Levin <i>et al.</i> , 2002)
	Labyrinthe radial à 16 bras	1	s.c./DMSO	PND 1-4	PND 51	m	↓ mémoire de référence et travail	
	Labyrinthe radial à 16 bras	1	s.c./DMSO	PND 1-4	PND 51	f	(↑) mémoire de référence et travail	(Aldridge <i>et al.</i> , 2005a)
	Labyrinthe en T							
Activité motrice spontanée	Labyrinthe en croix surélevé	1 et 5	s.c./DMSO	GD9-12	PND 28-56	m,f	hyperactivité (durant la phase initiale)	(Icenogle <i>et al.</i> , 2004)
	T-Maze	1 et 5	s.c./DMSO	GD 17-20	PND 28-56	m,f	hyperactivité (durant la phase initiale)	
	labyrinthe en 8	1 et 5	s.c./DMSO	GD 17-20	PND 28-56	f	↓ habituation, ↓ activité locomotrice spontanée sur 60 min	(Levin <i>et al.</i> , 2002)
	Labyrinthe en 8	5	s.c./DMSO	GD9-12	PND 28-56	f et m	↓ habituation, ↓ activité loco spontanée sur 60 min	(Icenogle <i>et al.</i> , 2004)
	Espace ouvert	6	gavage	GD 15-18	PND 70	m	augmentation de l'activité locomotrice spontanée	(Riccieri <i>et al.</i> , 2006)
	Espace ouvert	1	s.c./DMSO	PND 1-4	PND 21	m	↓ activité locomotrice spontanée	
	Espace ouvert	1(5)	s.c./DMSO	PND 11-14	PND 21	m et f	pas d'effet sur l'activité locomotrice spontanée	(Dam <i>et al.</i> , 2000)
	Labyrinthe en croix surélevé	1	s.c./DMSO	PND 1-4	PND 53	m	↓ niveau d'anxiété	(Aldridge <i>et al.</i> , 2005)
	Labyrinthe en croix surélevé	3	Oral (gavage)	GD 15-18	PND 70	m, f	↓ niveau d'anxiété	
	Labyrinthe en croix surélevé	3	s.c./DMSO	PND 11-14	PND 70	m,f	↓ niveau d'anxiété	(Riccieri <i>et al.</i> , 2006)
comportement Social			s.c./DMSO	PND 1-4	PND 21	m	↓ nombre de "tearing"	
		5	s.c./DMSO	PND 11-14	PND 21	m,f	↑ nombre de "tearing" and "grooming"	(Dam <i>et al.</i> , 2000)
	confrontation mâle/mâle	6	oral	GD 15-18	PND 70	m	↑ comportement agressif	
	confrontation mâle/mâle	3	s.c./DMSO	PND 11-14	PND 70	m	↑ comportement agressif	
	présentation jeune	1 & 3	s.c./DMSO	PND 11-14	PND 90	f	↓ comportement maternel	(Riccieri <i>et al.</i> , 2006)
	comportement maternel	3	s.c.	PND 11-14	PND 60	f	↓ comportement maternel	(Venerosi <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 1.1 : Principaux effets comportementaux persistants liés à une exposition subtoxique au CPF chez les rongeurs. (↓= diminution, ↑ = augmentation ; m= mâle ; f= femelle)

Effet sur le comportement social

Les influences sur le comportement social d'une exposition prénatale ou postnatale au CPF chez les souris ont fait l'objet de quelques études par Ricceri, Venerosi et collaborateurs.

Il a été mesuré chez les souris mâles adultes une augmentation du niveau d'agressivité après une exposition prénatale (GD 11-15) subtoxique indirecte au CPF (réalisée par traitement des mères à 6 mg/kg.jour voie orale). Cette augmentation de l'agressivité est survenue également pour une exposition postnatale (PND 11-14) subtoxique au CPF (3 mg/kg.jour) (Ricceri *et al.*, 2006).

Dans cette expérience, une altération du comportement maternel lors de la présentation de nouveau-nés âgés de 1 à 3 jours à une femelle non parturiente adulte (PND90) est mise en évidence chez les animaux exposés à la plus forte dose chronique de CPF (6 mg/kg.jour) durant la gestation (GD 11-15) (Ricceri *et al.*, 2006).

Dans une autre expérience concernant l'anxiété développementale, l'équipe de Ricceri a montré qu'une exposition postnatale tardive (PND 11-14) à des doses subtoxiques de CPF (3 mg/kg.jour) provoque une diminution de la motivation des mères à s'occuper de leurs portées (au premier jour après parturition). Ces souris femelles exposées au CPF présentent moins d'anxiété (dans le « *Dark and Light test* ») que les femelles non exposées après une heure de séparation de leur portée, ce qui est traduit comme une baisse de la force du comportement maternel (Venerosi *et al.*, 2008).

Aussi, Venerosi a montré que les comportements de reconnaissance et de communication sociale étaient altérés chez la souris femelle adulte par une exposition prénatale (GD 15-18) subtoxique au CPF à 6 mg/kg.jour et pas à 3 mg/kg.jour. Par contre, les résultats de cette expérience de mesure de comportements de communication sociale entre souris n'ont pas pu mettre en évidence d'effet développemental du CPF lorsque la période d'exposition était postnatale, que ce soit pour 1 ou 3 mg/kg.jour (Venerosi *et al.*, 2006).

Selon Venerosi et collaborateurs, les altérations des comportements sociaux chez la souris par le CPF durant le développement du cerveau pourraient être induites par une interférence de cet insecticide avec des mécanismes neuroendocriniens hypothalamiques qui régulent les réponses sociales. Parmi ces mécanismes, intervient l'ocytocine qui joue le rôle de neurotransmetteur neuromodulateur dans le comportement maternel (Venerosi *et al.*, 2008). La raison du postulat de Venerosi et collaborateurs est que l'ocytocine intervient aussi dans

les autres comportements qui sont altérés par le CPF périnatalement. En effet, la libération d'ocytocine dans l'amygdale est essentielle dans la reconnaissance sociale (Choleris *et al.*, 2007), et les récepteurs à ocytocine de l'hypothalamus et de l'amygdale modulent le niveau d'anxiété (Bale *et al.*, 2001). L'ocytocine et la vasopressine (autres neuropeptide hypothalamiques) sont également impliqués dans les comportements d'agressivité inter-mâles chez la souris (Voci and Carlson, 1973; Veenema *et al.*, 2007; Campbell, 2008).

Les travaux d'Aldridge et collaborateurs ont permis de montrer des effets développementaux sur le comportement affectif et social par des expositions subtoxiques au CPF à différents moments du développement, et en même temps que des perturbations du système sérotoninergique, et en particulier des récepteurs 5HT_{1A} (Kusserow *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a; Aldridge *et al.*, 2005b).

L'altération de plusieurs systèmes de neurotransmetteurs serait donc impliquée dans les effets comportementaux de type social provoqués par une exposition périnatale au CPF.

1.5 OBJECTIFS DE LA THÈSE.

Nous avons vu qu'une exposition subtoxique au CPF réalisée durant le développement du cerveau, qui est une période qui s'étend de la neurulation à l'adolescence, peut produire divers troubles comportementaux chez le rat et la souris. Ces troubles comportementaux sont de diverses natures : altération de la mémoire, modification du niveau d'anxiété et d'activité et perturbation du comportement social, et s'avèrent être la conséquence de plusieurs mécanismes différents. Ces altérations comportementales diverses, dont l'occurrence, la nature et l'intensité varient en fonction de la dose, mais aussi en fonction de la période d'exposition (qui reste toujours courte : 4 jours).

Si de nombreuses expériences ont tenté d'étudier les effets développementaux conséquents à une période courte d'exposition, il y a par contre peu ou pas de données concernant les effets comportementaux que pourraient produire une exposition longue au CPF, et qui couvrirait non pas une petite partie du développement, mais plutôt une longue partie du développement du cerveau.

Nous n'avons trouvé qu'une étude comportementale concernant les effets d'une exposition chronique périnatale de type long durant le développement (GD6-PND 10), réalisés à l'aide de doses subtoxiques de CPF et cette étude ne montre pas d'effets comportementaux persistants chez les rats (Maurissen *et al.*, 2000).

Un des buts de cette thèse est de mettre en évidence des effets comportementaux liés à une exposition subtoxique au CPF qui couvre une grande partie du développement du cerveau chez la souris.

Étant donné le manque d'information concernant la toxicité développementale de la PHO, un autre but de la Thèse est de déterminer les effets comportementaux persistants que pourrait également produire une exposition subtoxique périnatale de type long à la PHO chez la souris. Un troisième but est de tenter de mettre en évidence l'effet de la dose et de la période sur le type et l'intensité de l'anxiété développementale produite par une exposition subtoxique périnatale et de type long au CPF.

Un quatrième but est d'étudier la participation d'un type de récepteur sérotoninergique dans les mécanismes des troubles persistants de l'anxiété produite par une exposition subtoxique au CPF durant une longue partie du développement chez la souris.

CHAPITRE 2 :

« TOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE
DU CHLORPYRIFOS ET DE LA
PHOSALONE
EN DOSES CHRONIQUES
SUBTOXIQUES:
ANALYSE COMPORTEMENTALE
CHEZ LA SOURIS CD1 ».

2 « TOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE DU CHLORPYRIFOS ET DE LA PHOSALONE EN DOSES CHRONIQUES SUBTOXIQUES : ANALYSE COMPORTEMENTALE CHEZ LA SOURIS CD1 ».

2.1 INTRODUCTION.

Les OP sont donc capables d'interférer avec le développement du cerveau et de produire des effets développementaux qui ne sont pas nécessairement identiques (Slotkin *et al.*, 2008f). Le cas du CPF a été le plus étudié. Les mécanismes de toxicité développementale qu'il met en œuvre peuvent survenir à des doses considérées comme non-toxiques, c'est-à-dire qui ne donnent pas lieu à des symptômes de toxicité cholinergique. Certains de ces mécanismes surviennent même sous le seuil d'action anticholinestérasique (Slotkin, 1999; Slotkin, 2004). De nombreux mécanismes de toxicité développementale du CPF ont été mis en évidence (chapitre 1.4.3.2). Il a été démontré que ces mécanismes peuvent induire des troubles développementaux persistants chez l'Homme (chapitre 1.4.3.1) et les rongeurs (chapitre 1.4.3.3).

Rappelons que les études épidémiologiques réalisées chez l'Homme ont notamment montré qu'une exposition chronique prénatale au CPF (dont le niveau est mesuré) pouvait produire des troubles neurodéveloppementaux chez les jeunes enfants (Young *et al.*, 2005), des troubles cognitifs et moteurs associés à des troubles de l'attention, à de l'hyperactivité chez les enfants de 3 ans (Rauh *et al.*, 2006), des réflexes anormaux chez les nouveau-nés et des troubles du développement chez les enfants de 2 ans (Eskenazi *et al.*, 2008).

Les études comportementales, réalisées chez les rats et souris, décrivent des altérations de la mémoire de travail et de référence, des perturbations du niveau d'activité locomotrice spontanée, des modifications du niveau d'anxiété, des modifications de l'occurrence des comportements sociaux et des modifications des comportements agonistes et maternels (Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a; Ricceri *et al.*, 2006; Venerosi *et al.*, 2006; Ricceri *et al.*, 2007; Venerosi *et al.*, 2008). Ses expériences ont en commun que les tests comportementaux sont faits chez l'adulte, que la période d'exposition est relativement courte

(4 jours) et survient durant le développement du cerveau. Aussi les doses choisies sont réputées sous le niveau d'inhibition d'ACHé qui donnerait des signes de toxicité observables ou systémiques dans le modèle animal utilisé. Pourtant, si l'on examine les résultats des tests comportementaux de chacune de ces études développementales, le type de comportement modifié, le sexe affecté, le sens de la modification comportementale peuvent varier d'une expérience à l'autre. La cause de ces différences dans les résultats obtenus serait principalement la période exacte d'exposition qui était choisie pour perturber un moment particulier du développement du cerveau, correspondant au moment précis de la mise en place d'un système ou d'une région du cerveau lié à une fonction comportementale spécifique. Dans cette optique, une série de périodes sensibles à l'exposition subtoxique de CPF pour l'obtention d'effets neurocomportementaux ont été relevées chez les rongeurs (chapitre 1.4.3.3).

- La période de fin de gestation (GD 17-20)(Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004), début de vie (PND 1-4) (Dam *et al.*, 2000), et la période plus tardive du développement (PND 11-14) (Ricceri *et al.*, 2003; Ricceri *et al.*, 2006) pour l'altération persistante du niveau de l'activité locomotrice spontanée.

- Les derniers jours durant la gestation (GD 17-20) (Levin *et al.*, 2002), et les premiers jours de vie (PND 1-4) (Levin *et al.*, 2001; Aldridge *et al.*, 2005a) pour l'occurrence de troubles cognitifs et d'apprentissage.

- Les premiers jours de vie postnatale (PND 1-4) (Aldridge *et al.*, 2005a) ainsi que la fin de la gestation et une période de développement tardive (PND 11-14) (Ricceri *et al.*, 2006) pour la perturbation du niveau d'anxiété.

- La fin de la gestation et plus particulièrement un moment à la fin du développement du cerveau (PND 11-15) pour l'induction de troubles de comportements sociaux tels que le comportement maternel et l'agressivité chez les souris (Ricceri *et al.*, 2003; Ricceri *et al.*, 2006; Venerosi *et al.*, 2006; Ricceri *et al.*, 2007; Venerosi *et al.*, 2008) et chez les rats (Kusserow *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a; Aldridge *et al.*, 2005b). Ricceri et collaborateurs soulignent la dépendance au sexe de ces effets développementaux.

Il n'y aurait donc pas une, mais plusieurs périodes sensibles au CPF à même de provoquer des effets développementaux divers. Nous nous interrogeons sur les effets comportementaux que peut bien occasionner une exposition de type long qui couvrirait toutes les périodes sensibles répertoriées par ces expériences d'exposition courte, dirigées à un moment précis du développement du cerveau. Nous allons donc utiliser dans notre expérience une exposition de

type long au CPF, à niveau bas, qui couvrirait la plupart des périodes sensibles recensées (de la fin de gestation à la période plus tardive du développement : GD 15-PND 14).

Nous voulons également étudier les effets développementaux d'un autre insecticide OP, la phosalone (PHO) et les comparer à ceux du CPF. En effet, contrairement au CPF, aucune étude n'a encore révélé de toxicité développementale de la PHO chez les mammifères. Le manque de donnée à ce niveau laisserait entendre que la PHO, dont le niveau de toxicité aiguë est très semblable à celui du CPF, pourrait être un bon candidat comme remplaçant des autres OP dont la toxicité développementale a été décelée chez les mammifères. Mettre le doigt sur les effets développementaux de la PHO par un modèle animal serait le premier argument scientifique qui suggérerait un possible danger de cette substance pour les mammifères et l'Homme.

2.2 OBJECTIFS.

Nous voulons mettre en évidence les effets développementaux produits par une exposition périnatale longue et subtoxique au CPF, un insecticide OP qui a fait l'objet de nombreuses études d'effets développementaux liés à des expositions chroniques de type court. Nous voulons également étudier les effets développementaux consécutifs à une exposition périnatale subtoxique de type long du phosalone, un insecticide OP qui n'a pas encore montré de toxicité développementale.

2.3 MATÉRIELS ET MÉTHODES.

2.3.1 PRODUITS

La solution de chlorpyrifos est préparée à partir de sa forme pure cristalline (Pestanal, Sigma-aldrich, Bernen- Belgium) que l'on dilue dans l'huile de Maïs (Sigma-aldrich, Bernen-Belgium). La solution de phosalone est élaborée à partir de la solution commerciale Zolone, (Cheminova, 500g de matière active par litre, Lemvig, Danemark). Le volume de solution d'exposition orale est standardisé à 100µl par 35 g de poids vif de souris.

2.3.2 ANIMAUX ET TRAITEMENTS.

Chaque souris femelle CD1 Swiss (laboratoires Charles Rivers, France) gestante d'une semaine est placée individuellement dans une cage en plastique transparent (32x15x13cm), couverte par une grille en acier inoxydable, dans des conditions standards de ventilation, de

lumière (cycle de 12 heures, lumière allumée à 8H00), de température (21°C constant) et d'hygrométrie (50% d'humidité). Ces souris ont un accès *ad libitum* à de l'eau fraîche et de la nourriture (Pavan Service, Belgique).

Dans cette expérience, les fœtus et jeunes animaux sont exposés aux OP durant une grande période du développement non pas directement, mais via la mère. En effet, les souris 'mères' sont traitées une seule fois par jour par voie orale (gavage), toujours le matin, durant la fin de la gestation : jour de gestation 15-19 (GD 15-18) et durant les deux premières semaines de lactation : du jour de la mise bas (jour post-natal 0) au jour post-natal 14 (PND 0-14). Les jeunes sont donc exposés via le placenta durant la fin de la gestation et via le lait après la naissance.

Les souris en gestation sont réparties de manière aléatoire afin de créer trois groupes d'exposition homogènes. On forme un groupe 'CPF' et un groupe 'PHO' dont les souris mères sont gavées respectivement avec 5 mg /kg.jour de chlorpyrifos et de phosalone ; et un groupe 'VEH' dont les souris mères ne seront gavées qu'avec le véhicule, c'est-à-dire l'huile de maïs, et mettrons au monde les souris contrôles.

Les portées sont limitées le jour de la naissance à huit jeunes dont 4 femelles et 4 mâles.

Une batterie de tests comportementaux a été réalisée chez la progéniture adulte afin de déterminer des effets développementaux à long terme. Quatre types de mesures comportementales ont été réalisés avec des outils différents. Le niveau d'activité locomotrice spontanée a été mesuré par un test l'actométrie automatisé et également à l'aide d'un « *videotracking* ». Nous avons évalué la mémoire des souris à l'aide d'un labyrinthe de Lashley III et d'un labyrinthe en T. Des mesures du niveau d'anxiété des souris ont été effectuées à la fois dans un « *Elevated Plus Maze* » (labyrinthe en croix surélevé) et dans un « *Light/Dark box test* » (test chambre claire/sombre). Enfin, nous avons tenté de détecter des signes de dépression chez la souris à l'aide d'un « *Forced Swimming test* » (test de nage forcée).

2.3.3 MESURES COMPORTEMENTALES.

2.3.3.1 Activité locomotrice spontanée

Test d'actométrie. 60 min

Matériel et mesures.

L'appareil d'actométrie (Figure 2.1) se compose d'une cage en acrylique (Plexiglass®) transparent de base carrée de 19,5 cm de côté et de 20,5 cm de haut. Le système est équipé d'émetteurs et capteurs de faisceaux infrarouges, situés à 2 cm de hauteur et à 6,5 cm des coins. Les faisceaux d'un même côté sont disposés parallèlement.

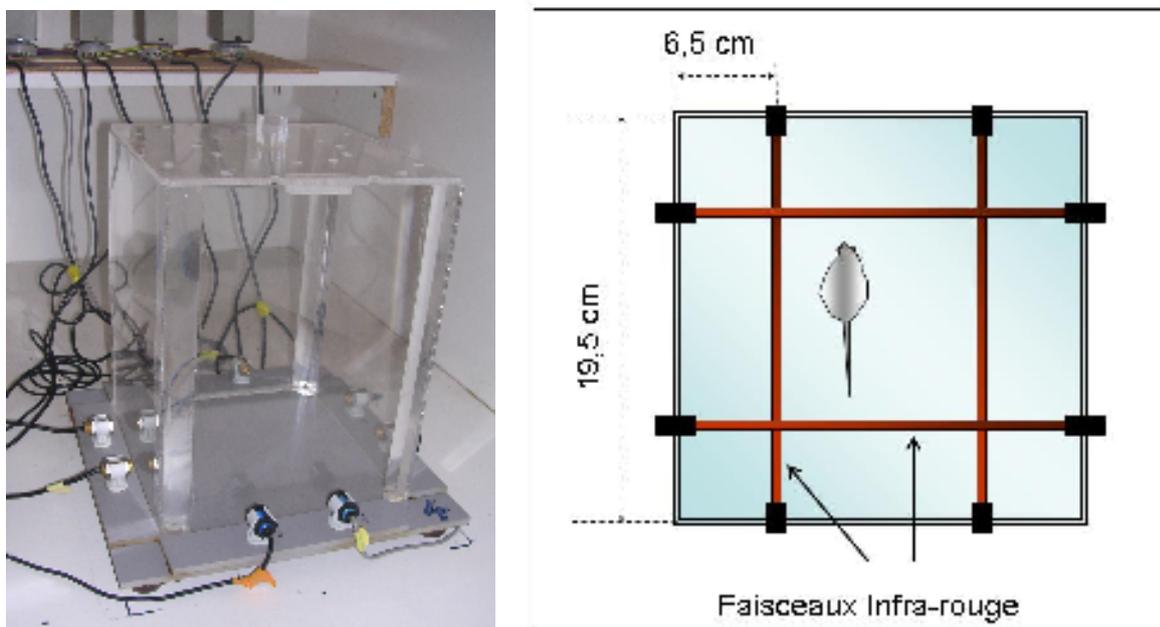


Figure 2.1. Appareil d'actométrie.

À gauche: photo de l'appareil dans l'enceinte.

À droite : représentation schématique du trajet des faisceaux infrarouges.

Chaque appareil de mesure est disposé au centre d'une chambre isolée de l'expérimentateur, insonorisée, ventilée et possédant un éclairage standardisé. Chaque croisement de faisceau par la souris est comptabilisé et enregistré via un logiciel informatique. Le nombre de croisements successifs de deux faisceaux parallèles opposés fournit une évaluation du niveau d'activité locomotrice de la souris (Quertemont *et al.*, 2004).

Procédure.

Afin de laisser le temps à l'animal de s'adapter aux nouvelles conditions, chaque souris est amenée dans la pièce où se réalise le test 30 minutes avant de débiter celui-ci. Après cette période, la souris est placée délicatement au centre de la chambre et pour une heure de test.

Afin de ne pas influencer les résultats d'un test par le précédent, la chambre est nettoyée avant le passage de chaque souris à l'aide d'une solution savonnée.

Test d'activité par traceur vidéo (« videotracking »)

Ce test se réalise dans des chambres dont les parois sont en bois peint en noir (40 x 40 x 40 cm) (figure 2.2). Un système de webcam à haute définition situé à 2 mètres au dessus des enceintes, couplé à un ordinateur, enregistre et analyse les mouvements des souris au cours du temps (60 minutes) via un logiciel spécialisé « *Videotrack® ; Automated Behavioral Analysis* » (Viewpoint, France). Le logiciel est capable également de discerner la locomotion en petits mouvements (5-20cm/s), en grands mouvements (>20cm/s) et les mouvements sur place (immobilité) des souris (<5cm/s). Le système est disposé de manière à ce que l'expérimentateur ne puisse être vu par les souris.

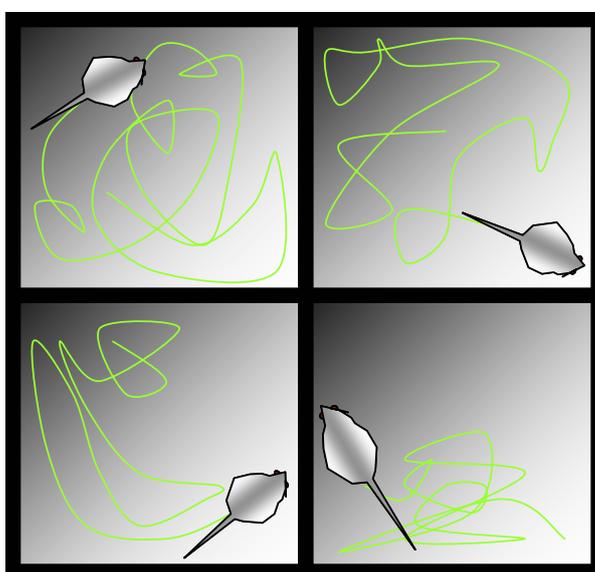


Figure 2.2 : Vidéotracking :
Représentation schématique du tracé du
parcours des animaux après quelques
secondes dans les chambres ouvertes.

Procédure : après une période d'adaptation à la pièce d'expérience (30 minutes) une souris est déposée au milieu de chaque enceinte, simultanément au déclenchement du logiciel d'analyse de mouvement. Les chambres sont nettoyées entre chaque mesure.

2.3.3.2 Mémoire et apprentissage

Etude de la Mémoire et de l'apprentissage dans le labyrinthe de Lashley III

Matériel.

Le labyrinthe de Lashley III (Denenberg *et al.*, 1991) a été réalisé à l'aide de plaques en plastique acrylique gris opaque et lisse. Il se compose d'une chambre de départ, de quatre couloirs parallèles et identiques (58 cm de long et 6 cm de large) ainsi que d'une chambre d'arrivée. Il existe une porte entre chaque partie du labyrinthe ainsi qu'une ouverture unique, disposée à 10 cm de la fin de chaque couloir, alternativement à une extrémité opposée, qui permet le passage d'un couloir à l'autre. Chaque couloir se termine donc en cul-de-sac (Denenberg *et al.*, 1991; Boehm *et al.*, 1996; Matzel *et al.*, 2003). L'appareil est disposé dans une enceinte en U afin que les extrémités des couloirs se présentent l'une vers un mur et l'autre en direction de l'ouverture (figure 2.3 A).

Fonctionnement et procédure

Le fonctionnement de base de ce labyrinthe réside dans l'apprentissage par la souris du chemin qui mène de la chambre de départ vers la chambre d'arrivée où un renforcement positif sous forme de récompense nutritive est mis à disposition de la souris (miel pops, Kellogg). Lors du parcours du labyrinthe, la souris est susceptible de prendre des mauvaises directions que nous nommerons erreurs. Ces erreurs sont de deux types. En effet, la souris peut aller jusqu'au bout du couloir au lieu de passer dans le couloir suivant. Dans ce cas, on dit qu'elle réalise une erreur en cul-de-sac (voir figure 2.3 A). Pour éviter de réaliser des erreurs en cul-de-sac, la souris doit faire appel à sa mémoire de référence. La souris peut également, après le passage d'un couloir à l'autre prendre à gauche ou à droite. Si elle prend la mauvaise direction, elle produit une « erreur en T ». Afin d'éviter de réaliser des erreurs en T, la souris devra faire appel plus spécifiquement à sa mémoire de travail (voir figure 2.3 B) (Boehm *et al.*, 1996).

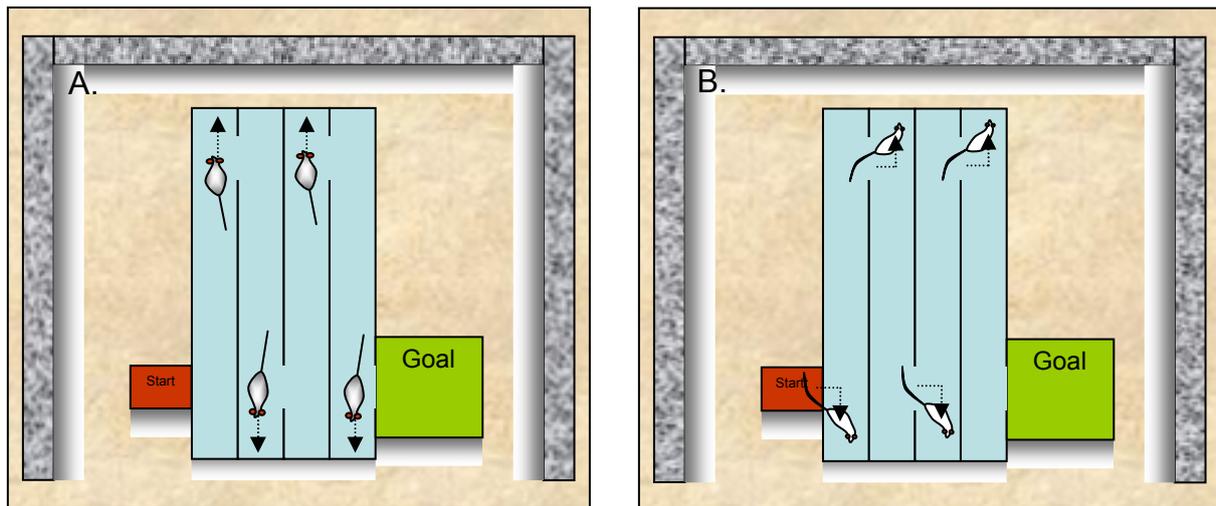


Figure 2.3 : Labyrinthe de Lashley.
A: erreurs en cul-de-sac; B: erreurs en T.

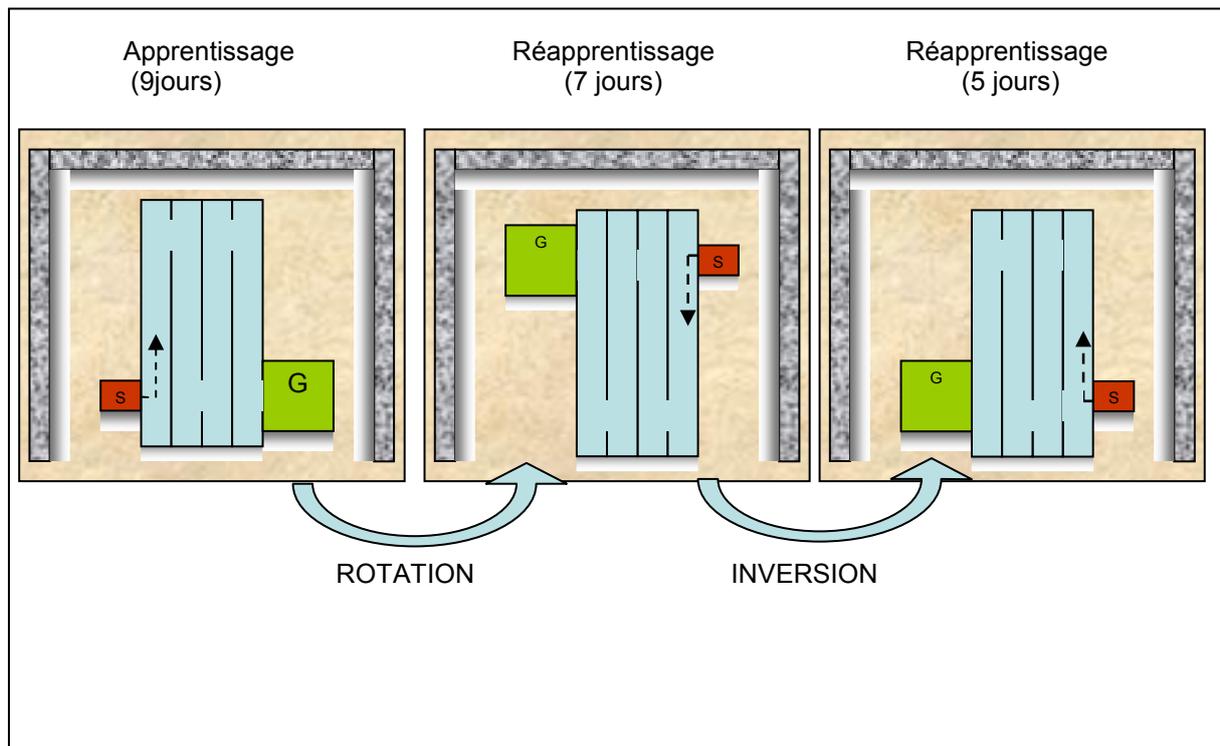
La procédure se déroule en plusieurs phases successives qui ont chacune un but précis.

1. Une phase préliminaire de régime alimentaire. Trois jours avant le premier test dans le labyrinthe, la portion de nourriture de chaque sujet mis en cage isolée est limitée afin de maintenir chaque individu à 90% de son poids normal. Ce régime alimentaire qui est maintenu d'une manière constante durant tout le test permet d'augmenter l'attrait de la récompense alimentaire et donc la motivation de la souris à atteindre la chambre d'arrivée.
2. Une phase d'habituation (PND 30). Le premier jour de test (L1), chaque sujet est disposé successivement dans les différentes parties et couloirs du labyrinthe, toutes portes fermées, afin que les animaux puissent explorer tout le labyrinthe et ne subissent pas un stress excessif lors du premier jour d'apprentissage.
3. Une phase d'apprentissage (PND31-39), dans laquelle chaque souris apprend, une fois par jour et ceci durant 9 jours, à atteindre la chambre d'arrivée. Au fur et à mesure des essais journaliers, les souris atteignent la chambre d'arrivée dans un temps de plus en plus court et en produisant de moins en moins d'erreurs. Cette phase permet de tester la capacité d'apprentissage des souris.
4. A la fin de cette première période d'apprentissage, le labyrinthe subit une rotation de 180 degrés. Débute alors une phase de réapprentissage de 7 jours (PND 40-46). Dans ces

nouvelles conditions, le chemin de parcours du labyrinthe est identique. Par contre les repères visuels très simples ici (murs ou ouverture au-delà des extrémités des couloirs) sont inversés. (Figure 2.4)

Le but de cette rotation est de déceler l'influence de l'exposition aux OP dans l'utilisation des repères visuels externes durant l'apprentissage du labyrinthe. Les sujets qui ont tenu en compte les repères externes lors de la première phase d'apprentissage peuvent être perturbés dans les essais de parcours réalisés après la rotation du labyrinthe et auront une probabilité plus grande de réaliser des erreurs que les sujets qui n'ont pas tenu en compte les critères externes (Deacon *et al.*, 2002).

5. Une fois cette phase de réapprentissage terminée, le labyrinthe est retourné comme dans un miroir de telle façon que seuls les passages de porte soient inversés de manière 'gauche/droite' (figure 2.4). Dans ce cas précis, après ces modifications de l'orientation des T, seuls les animaux ayant une mémoire de travail performante vont faire des erreurs en T (Boehm *et al.*, 1996). A nouveau, les souris (PND 47-53) vont réapprendre, une session par jour (INV1-7), le parcours du labyrinthe.



**Figure 2.4 : Différentes étapes dans la procédure du test de Lashley III.
S= chambre de départ ; G= chambre d'arrivée**

Les moyens de mesure.

Pour l'analyse des résultats, il existe plusieurs critères : le temps de parcours, l'index d'apprentissage et le pourcentage de l'occurrence d'erreurs en T

L'index d'apprentissage (LI pour « *Learning Index* ») est le nombre d'actions correctes divisé par le nombre total d'actions réalisées par la souris durant un essai. Plus exactement : $LI = \frac{\text{nombre de T réussis}}{\text{nombre de T réussis} + \text{nombre d'erreurs en T} + \text{nombre d'erreur en cul-de-sac} + \text{nombre de retours en arrière}}$ (Denenberg *et al.*, 1991). L'index d'apprentissage approche 1 lorsque la souris ne fait plus d'erreur.

L'utilisation de la comparaison du pourcentage d'erreurs en T avant et après l'inversion permet une évaluation de la mémoire de travail. En effet, un plus grand pourcentage d'erreurs en T après inversion du labyrinthe est signe que la souris choisit la direction apprise durant la phase précédente, et donc que la mémoire de travail qui était utilisée durant l'apprentissage était performante. A l'inverse, un faible pourcentage d'erreurs en T après retournement montre des faiblesses dans la mémoire de travail (Boehm *et al.*, 1996).

Déroulement d'une session type.

Une fois par jour, chaque souris est amenée dans la salle de test 5 minutes avant le début du test où elle pesée. Chacune est ensuite individuellement déposée délicatement dans la chambre de départ où elle est confinée 10 secondes. Après l'ouverture de la porte, la souris peut accéder librement à toutes les parties du labyrinthe qu'elle parcourt jusqu'à atteindre la chambre d'arrivée au milieu de laquelle se trouve le renforcement. La souris y est enfermée une minute, à la fois pour lui donner le temps de profiter du renforcement alimentaire et de l'empêcher de parcourir le labyrinthe à l'envers.

Chaque procédure est enregistrée via une Webcam (QuickCam Pro5000, Logitech) et un ordinateur, afin d'analyser le parcours de l'animal et de répertorier les erreurs *a posteriori*. Le chronomètre est déclenché au moment de l'ouverture de la porte et est éteint dès que l'animal touche le renforcement. Le labyrinthe est lavé entre chaque procédure.

Etude de la mémoire dans le labyrinthe en T : le test d'alternance spontanée.

Matériel.

Il s'agit d'un labyrinthe (figure 2.5) dont les parois sont en plastique acrylique transparent, et la base en plastique acrylique gris opaque. Il est constitué de trois bras de 50 cm de long, 10 cm de large et 20 cm de haut. Le bras de départ est associé perpendiculairement aux deux bras d'arrivée de manière à former un T. La chambre de départ se trouve entre la base du T et une porte située à 15 cm plus loin. Deux autres portes sont disposées à l'entrée de chacun des deux bras d'arrivée. Chacune des portes est transparente, très légère et peut être bloquée par l'expérimentateur. La particularité de ces portes à bascule réside dans leur conception d'ouverture à sens unique, empêchant la souris de revenir en arrière.

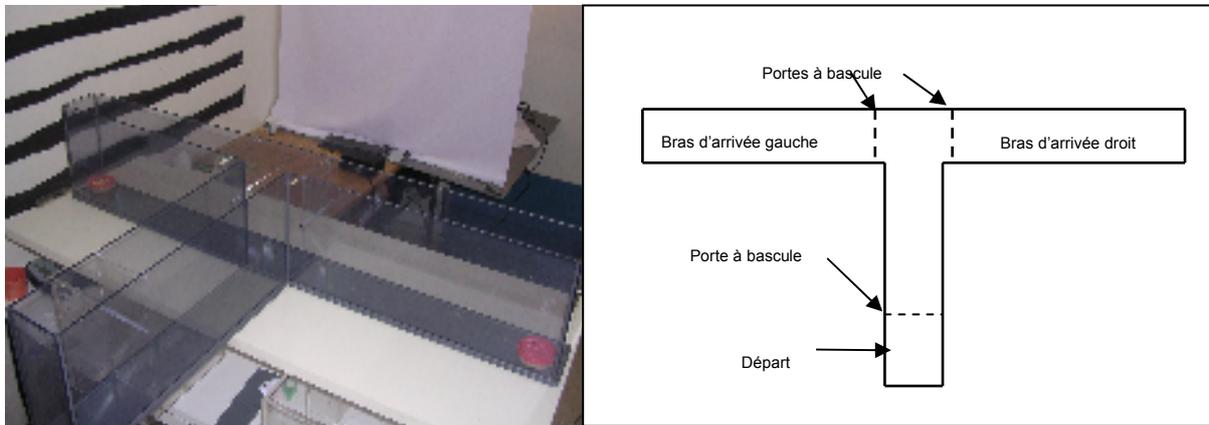


Figure 2.5 : Labyrinthe en T transparent.

Procédure

La procédure de test d'alternance spontanée dans le labyrinthe en T est une adaptation presque identique à celle utilisée par Gerlai (Gerlai, 1998).

Pour chaque session, une souris (PND80) est confinée dans la chambre de départ pour 20 secondes. Ensuite, une fois la porte ouverte, elle peut parcourir le bras principal à l'extrémité duquel elle devra choisir de tourner à droite ou à gauche, afin d'entrer dans un des bras d'arrivée où elle restera 20 secondes. La différence entre notre procédure et celle de Gerlai réside dans la manière dont l'animal retourne dans la chambre de départ afin de réaliser la session suivante. En effet, dans notre procédure, après sa période de confinement dans le bras d'arrivée, la souris est transportée par l'expérimentateur dans la chambre de départ afin qu'une nouvelle session débute, alors que la procédure de Gerlai permet à la souris de retourner par elle-même à la chambre de départ avant de débiter la session suivante.

Il est permis à la souris de réaliser 14 sessions. Lors de la première session, le choix du bras d'arrivée est forcé par le blocage de l'entrée d'un des deux bras.

Le principe de ce test réside dans la particularité des rongeurs, de présenter un comportement exploratoire fort développé, qui pousse ces animaux à prendre un nouveau chemin chaque fois que cela est possible. De cette manière, dans le labyrinthe en T, la souris alternera successivement son choix du bras d'arrivée.

Si l'alternance trouve son origine dans la force du comportement exploratoire, elle fait appel à la mémoire spatiale de la souris (Gerlai, 1998; Lalonde, 2002). La mesure de l'alternance spontanée peut donc nous renseigner sur l'état de la mémoire spatiale de la souris.

Mesures et critères.

Chaque fois qu'une souris choisit d'entrer dans un bras d'arrivée différent de celui choisit précédemment, elle alterne son choix et il lui est attribué un point. Dans le cas contraire l'essai vaut 0 point. Le niveau d'alternance des animaux pour les 14 essais est calculé par le % d'alternance : $(\text{nombre d'alternance}/13) \times 100$.

2.3.3.3 Anxiété et dépression

Mesure de l'Anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé

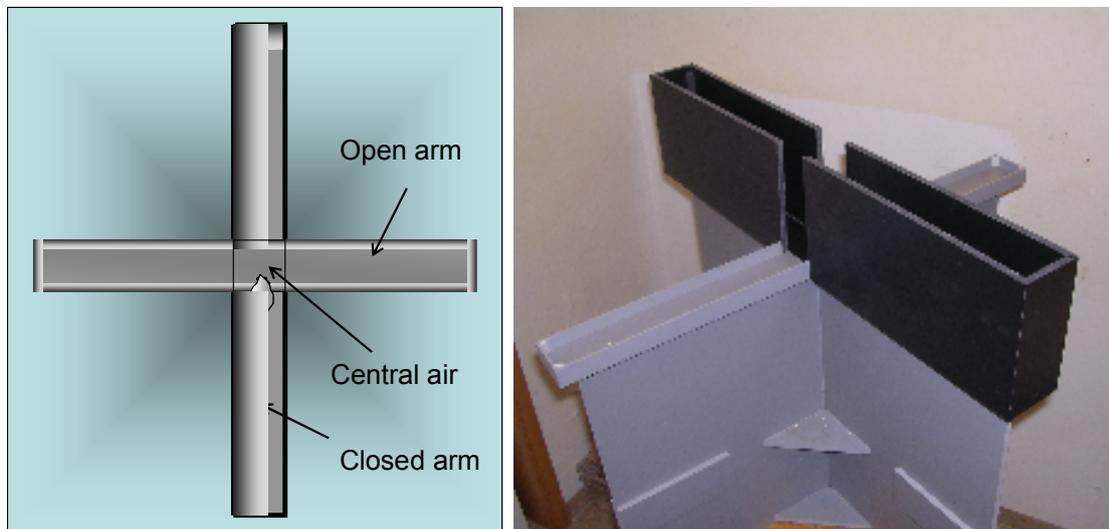


Figure 2.6 : Labyrinthe en croix surélevé (« *Elevated Plus Maze* », EPM).

Matériel

Le labyrinthe en croix surélevé (figure 2.6) consiste en quatre bras horizontaux, de taille identique ($L = 30 \text{ cm} \times l = 5 \text{ cm}$) reliés à une extrémité par une plateforme centrale ($5 \times 5 \text{ cm}$). Les deux bras opposés possédant un petit rebord ($2,5 \text{ cm}$) forment les bras ouverts ou « *open arms* » et sont placés perpendiculairement aux deux autres bras à haut rebords (15 cm), nommés bras fermés ou « *closed arms* »

Les bras ouverts sont en plastique acrylique opaque gris, alors que la plateforme centrale et les bras fermés sont fabriqués en plastique acrylique noir opaque. Le labyrinthe est surélevé par un axe central à une hauteur du sol de 80 cm (Tambour *et al.*, 2005).

L'appareil est isolé de l'expérimentateur par un panneau en bois afin d'éviter toute perturbation du test. Les sessions sont enregistrées via un système Webcam (QuickCam pro5000, Logitech) relié à un ordinateur pour analyses ultérieures.

Procédure

Une session se déroule toujours de la même manière : chaque souris est adaptée durant 5 minutes à la pièce de test, puis placée dans un bras fermé (toujours le même). Elle peut dès ce moment explorer librement le labyrinthe pendant 5 minutes.

Au jour PND 49, 10 souris par sexe et par groupe (sauf les VEH : n=8 mâles et 8 femelles) subissent individuellement ce test dans un ordre aléatoire préétabli afin de permettre une répartition des différents groupes dans le temps.

Les bras ouverts fournissent des conditions spatiales aversives aux souris alors que les bras fermés pas. Dans ce labyrinthe, les souris sont partagées entre leur volonté d'explorer le labyrinthe, qui dépend de la force de leur comportement exploratoire (fortement développé chez les rongeurs) et la crainte des lieux ouverts (bras ouverts). L'équilibre entre ces deux forces est perturbé chez les animaux anxieux. Plusieurs mesures permettent d'évaluer le niveau d'anxiété dans ce labyrinthe. Premièrement, le % de temps passé dans les bras ouverts fournit une évaluation du niveau d'anxiété des souris dans laquelle plus les animaux ont un niveau d'anxiété élevé, moins ils passeront de temps dans les bras ouverts (Shepherd *et al.*, 1994; Carobrez and Bertoglio, 2005). La deuxième mesure est comportementale. En effet, lorsqu'une souris explore un bras ouvert, elle peut réaliser des « *Head-dipping* ». Il s'agit de mouvements dans lequel la souris exprime une volonté de descendre du bras en se penchant franchement par-dessus le petit rebord, la tête dirigée vers le bas. Il est considéré que le niveau d'anxiété est inversement proportionnel au nombre de comportements « *head-dipping* » réalisés (Shepherd *et al.*, 1994; Carobrez and Bertoglio, 2005).

De plus, le nombre de passages au centre du labyrinthe peut donner une évaluation de l'activité des souris (Shepherd *et al.*, 1994; Carobrez and Bertoglio, 2005).

Mesure de l'Anxiété dans le test de chambre claire ou sombre ou « *Light/dark box test* »

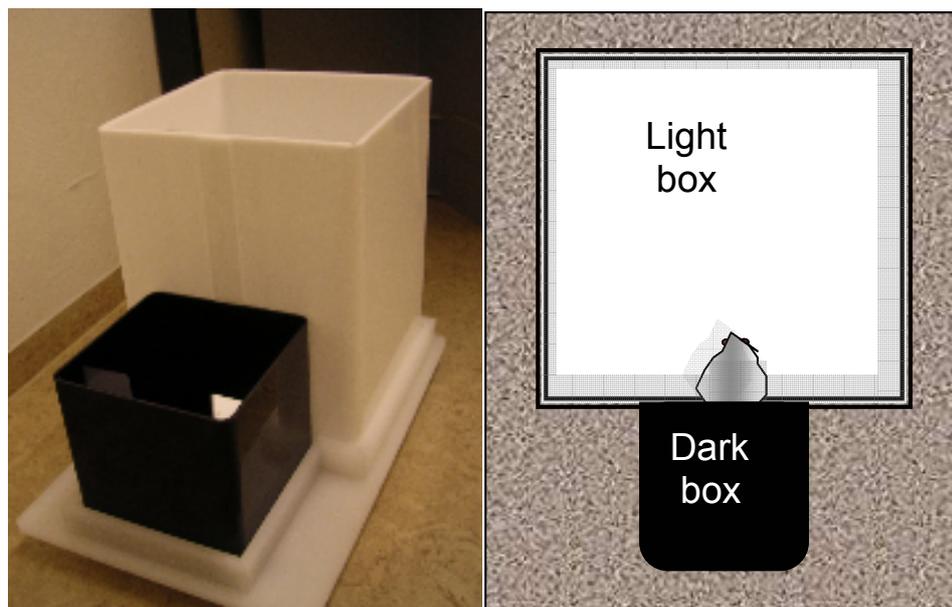


Figure 2.7 : le « *Light/dark box test* » ou test des chambres claire et sombre.

Matériel.

Le « *Light/dark box* » (figure 2.7) est constitué, comme son nom l'indique, d'une petite chambre sombre en plastique opaque : « *dark box* » (16x16x16 cm), dont le sommet est couvert d'un plastique obturant la lumière, et d'une grande chambre claire plus grande (25x25x30cm), non couverte, fabriquée en plastique acrylique translucide blanc: « *light box* ». Les compartiments sont connectés par une ouverture (5x5cm) qui permet à la souris de passer librement d'une chambre à l'autre. Un spot de 500 Watt halogène permet d'éclairer de manière indirecte l'appareil de test et d'augmenter la clarté de la chambre claire. Le contraste entre les deux chambres s'en trouve accentué.

Procédure.

Au jour PND 38, 10 souris de chaque sexe et de chaque groupe d'exposition (CPF, PHO et VEH) sont individuellement déposées dans la chambre claire (face à la porte), et il leur est permis de parcourir l'appareil durant 5 minutes. L'ordre aléatoire de passage des souris dans le test est déterminé auparavant afin de les répartir de manière homogène au cours de la journée. Chaque sujet est introduit dans la salle de test 5 minutes avant le début de celui-ci, afin de permettre limiter le stress lié au nouvel environnement.

Une Webcam reliée à un ordinateur permet d'enregistrer chacune des sessions et d'analyser à *posteriori* le temps passé dans chacune des chambres ainsi que le nombre de passages d'une chambre à l'autre.

Par sa plus grande taille, et parce qu'elle est illuminée, la chambre claire fournit des stimuli anxiogéniques pour les souris que la chambre sombre ne produit pas. Dans cet appareil, le pourcentage de temps passé dans la chambre sombre donnera une évaluation de l'anxiété des animaux, où plus l'animal passe de temps dans la chambre sombre, plus son état d'anxiété est considéré élevé (Bourin and Hascoet, 2003). Le nombre de transitions du sujet d'une chambre à l'autre peut fournir également une estimation de l'anxiété chez les souris. Dans ce cas, le niveau d'anxiété sera inversement proportionnel au nombre de transitions réalisé par les souris (Bourin and Hascoet, 2003).

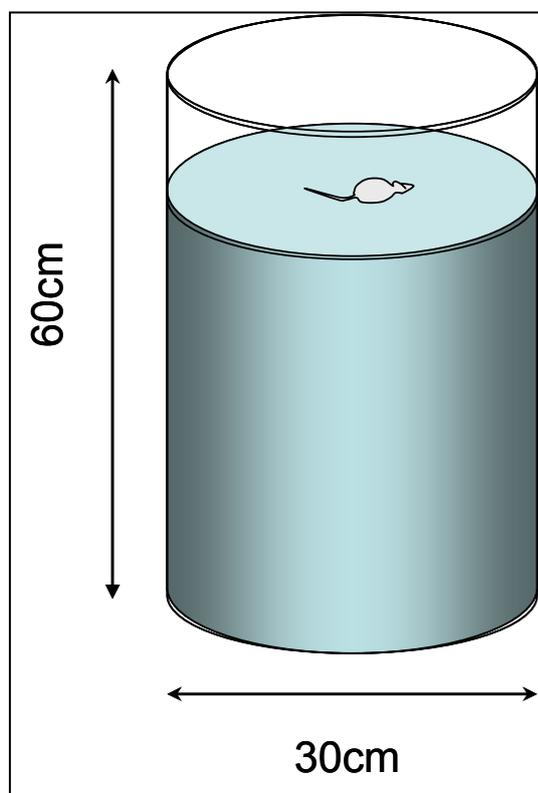
Mesure du niveau de dépression dans le test de nage forcée

Figure 2.8 : Appareil de test de nage forcée.

Matériel

Il s'agit d'une cuve cylindrique en plastique opaque, de 60 cm de haut et 30 cm de diamètre remplie à 75% de sa hauteur avec de l'eau à 28°centigrade. (Figure 2.8)

Procédure

Une souris est habituée durant 10 minutes à la pièce de test avant d'être délicatement déposée à la surface de l'eau. Le sujet peut librement nager durant 10 minutes.

Le choix de la souris se fait alternativement dans un des 3 groupes d'exposition.

Une Webcam (QuickCam Pro5000, Logitech), située environ 1 mètre au dessus du bassin, est reliée à un ordinateur qui permet d'enregistrer chaque session afin de l'analyser *a posteriori*.

Dans ce modèle animal, nous mettons la souris dans une situation où elle doit « lutter pour vivre » en nageant. Le temps d'immobilité de l'animal est interprété comme un manque de volonté à survivre, et considéré comme un signe de dépression chez la souris. La mesure du % de temps d'immobilité durant ce test permet donc d'évaluer le niveau de dépression des souris (Porsolt *et al.*, 1977; Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

2.4 RÉSULTATS

2.4.1 MESURE DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE.

Pour réaliser ce test, nous avons repris deux femelles et deux mâles par famille, et cinq familles par traitement (CPF, PHO et VEH), ce qui nous a permis de travailler avec un n=10 par sexe et par groupe d'exposition.

2.4.1.1 Mesure de l'activité locomotrice dans le test d'actométrie (60 min).

Mesure de l'activité locomotrice spontanée des descendants.

Dans un premier temps, nous avons analysé les données et répertorié les moyennes des mesures d'activité spontanée sans tenir compte du sexe de la progéniture (Figure 2.9).

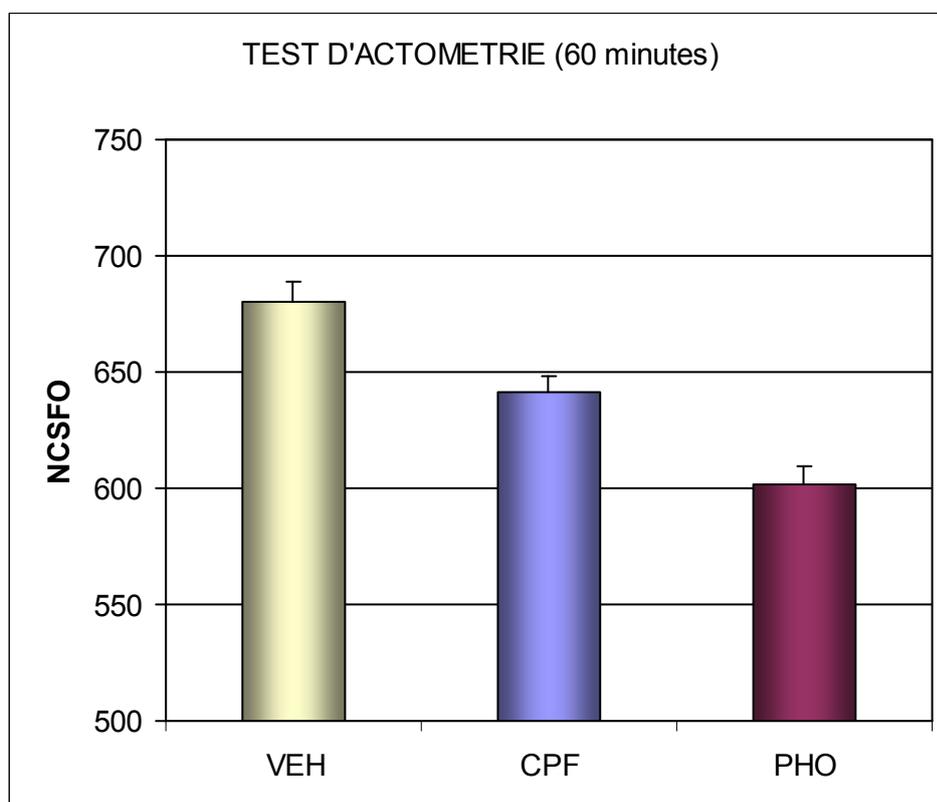


Figure 2.9 : Test d'actométrie. Nombre de croisements successifs de faisceaux opposés (NCSFO) pour les souris exposées au chlorpyrifos (CPF), à la phosalone (PHO) et pour les souris non exposées (VEH). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm l'erreur standard sur la moyenne (ESM). n=20 par groupe.

La moyenne du nombre de croisements successifs de faisceaux opposés (NCSFO) réalisés dans ce test d'actométrie de 60 minutes est de $680 \pm 8,84$ chez les descendants du groupe VEH. Celle du groupe exposé au CPF est un peu plus basse : $641 \pm 6,96$ et celle du groupe PHO encore un peu plus basse : $602 \pm 7,80$. L'ANOVA factorielle simple ne détecte pas de différence entre groupe d'exposition : $F(2, 54)=1,1869$; $p=0,3130$. Nous avons réalisé un test de Dunnett afin de comparer la moyenne de chacun des groupes d'exposition aux insecticides au groupe non exposé (VEH), en posant comme hypothèse les moyennes des groupes exposés plus basses que le groupe VEH. La moyenne des animaux exposés au CPF ($p=0,3448$) n'est pas significativement plus basse que celle du groupe VEH mais une légère tendance à une activité locomotrice plus basse existe chez les souris exposées au PHO ($p=0,1113$) par rapport au souris du groupe VEH. Sans dissocier les résultats de animaux des deux sexes au sein des portées, nous ne décelerions donc qu'une petite tendance à la diminution de la locomotion spontanée chez les souris exposées à la PHO.

Bien que nous n'avons pas pu déterminer une différence significative entre les animaux des deux sexes (ou genre) pour tous les groupes d'exposition (ANOVA factorielle : effet 'sexe' $p=0,4625$; effet 'sexe x groupe d'exposition' : $p=0,5730$), nous avons décidé d'analyser les résultats des animaux de sexe opposé séparément. En effet, certains autres effets, notamment ceux concernant le niveau d'anxiété se sont révélés être dépendants du sexe, et requièrent un appui de données précises concernant leur locomotion spontanée pour leur validation.

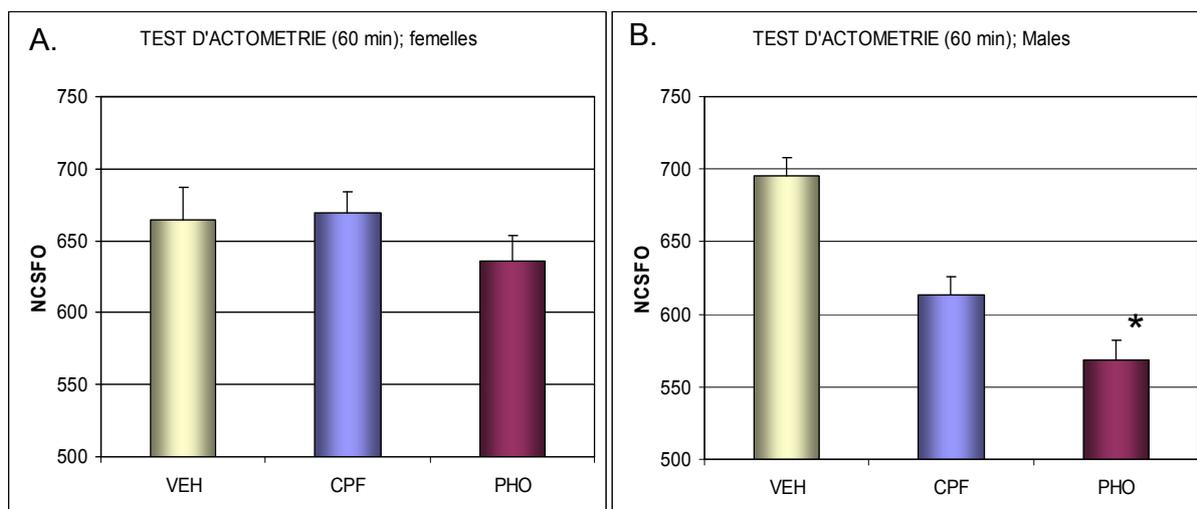


Fig. 2.10 : Mesure de l'activité locomotrice spontanée par un test d'actométrie de 60 minutes chez les descendants femelles (A) et mâles (B) : nombre de croisements successifs de faisceaux opposés (NCSFO) présenté sous forme de moyenne \pm ESM chez les mâles non exposés (VEH), les mâles exposés au chlorpyrifos (CPF) ou à la phosalone (PHO).

n=10 par groupe et par sexe.

*** : $p < 0,05$ selon le test Dunnett : PHO < VEH)**

Mesure de l'activité locomotrice spontanée chez les femelles.

Les moyennes d'activité locomotrice spontanée (NCSFO) des souris femelles durant une heure (figure 2.10.A) se montrent relativement semblables chez les souris VEH ($664 \pm 22,42$) et les souris exposées au CPF ($669 \pm 15,33$). La moyenne des souris femelles du groupe exposé à la phosalone (PHO : $636 \pm 17,53$) est en moyenne un peu plus basse que celles des deux autres groupes mais cette différence est non significative ($F(2, 27)=0,0927$, $p=0,9117$). Le test de Dunnett rejette d'ailleurs l'hypothèse d'une plus petite moyenne du NCSFO réalisé par les souris exposées à chaque insecticide par rapport aux souris VEH (CPF < VEH : $p=0,6872$; PHO < VEH : $p=0,5230$).

Nous concluons dans ces conditions de test et par ce moyen de mesure que ni l'exposition au CPF, ni celle au PHO n'influence de manière significative le niveau d'activité locomotrice spontanée chez les souris femelles adultes.

Mesure de l'activité locomotrice spontanée chez les mâles.

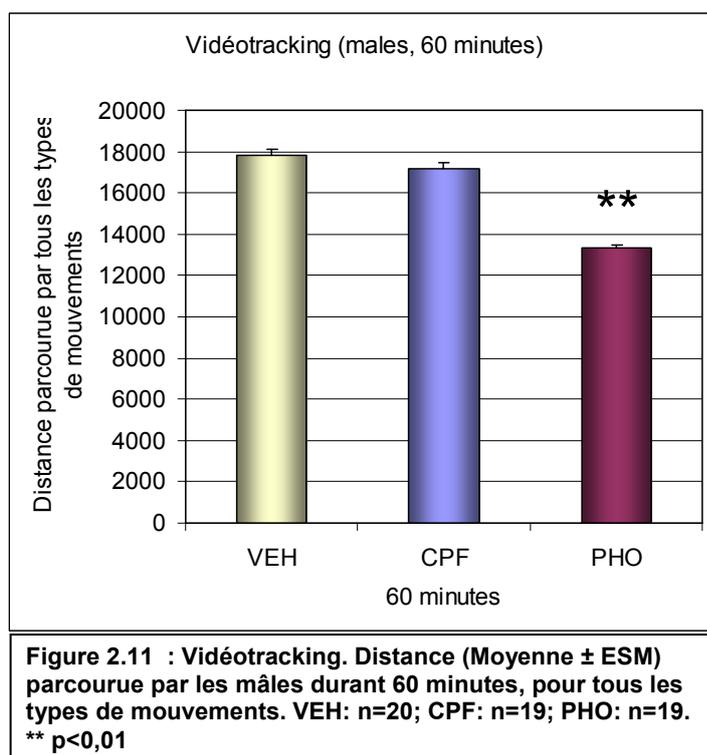
La moyenne du nombre de croisements successifs de faisceaux opposés (NCSFO) réalisés par les souris mâles dans le test d'actométrie (figure 2.10.B) apparaît en moyenne plus grande chez les animaux VEH ($696 \pm 12,31$) que chez les sujets exposés au CPF ($614 \pm 12,54$) ou à la PHO ($568 \pm 13,48$). L'ANOVA factorielle globale détermine une tendance à une différence de moyenne d'activité entre groupes d'exposition : $F(2, 27)=2,5419$, $p=0,0974$. Un test de Dunnett détermine que la moyenne d'activité des souris mâles exposées au CPF n'est pas significativement plus basse que celle des souris mâles VEH (CPF<VEH : $p=0,1387$) mais bien celle des souris mâles exposées à la PHO (PHO<VEH : $p=0,0315$).

Donc, l'exposition au CPF a induit comme effet développemental une petite tendance à diminuer l'activité locomotrice des mâles tandis que l'exposition à la PHO diminue de manière significative l'activité locomotrice des souris mâles.

2.4.1.2 Mesure de l'activité locomotrice spontanée par le traceur vidéo (mâles).

En fonction des résultats issus dans le test d'actométrie, nous avons utilisé cette méthode afin de préciser les changements du niveau d'activité survenus chez les mâles. Il ne s'agit pas des mêmes souris que celles utilisées dans le test d'actométrie décrit ci-avant (chapitre 2.4.1.1).

Nous avons dans un premier temps comparé les moyennes des distances parcourues par tous les types de mouvements analysés par le système de videotracking, et ce durant une heure, et pour chacun des groupes d'exposition : VEH, n=20 ; CPF, n=19 ; PHO, n=19. (Les résultats



de deux sujets ne furent pas tenus en compte pour des raisons techniques). La figure 2.11 présente la moyenne de la distance parcourue durant une heure par les souris mâles qui paraît plus haute chez les souris non exposées aux OP (VEH : 17813 ± 296cm) que chez les animaux exposés au CPF (17140 ± 325cm) et beaucoup plus haute que celle des animaux exposés au PHO (13322 ± 134cm).

En effet, l'ANOVA détermine une différence significative entre groupes d'exposition ($F(2, 55) =$

4,2292, $p=0,0196$). Le test de Dunnett confirme que la distance parcourue par les souris mâles exposées à la PHO est significativement plus basse que celle des VEH (PHO<VEH : $p=0,0084$) et que par contre, la distance parcourue par les souris mâles exposées au CPF n'est pas significativement différente de celle des souris VEH (CPF<VEH : $p=0,4938$).

Le système du videotracking nous permet également de mesurer l'évolution de la distance parcourue au cours des 60 minutes passées par les souris mâles des trois groupes d'exposition. Nous avons choisi de la présenter par intervalles de 5 minutes (figure 2.12). L'évolution dans le temps de la distance montre que toutes les moyennes diminuent avec le temps. L'ANOVA répétée confirme cette évolution significative ($F(11, 605)=27,346, p<0,0001$).

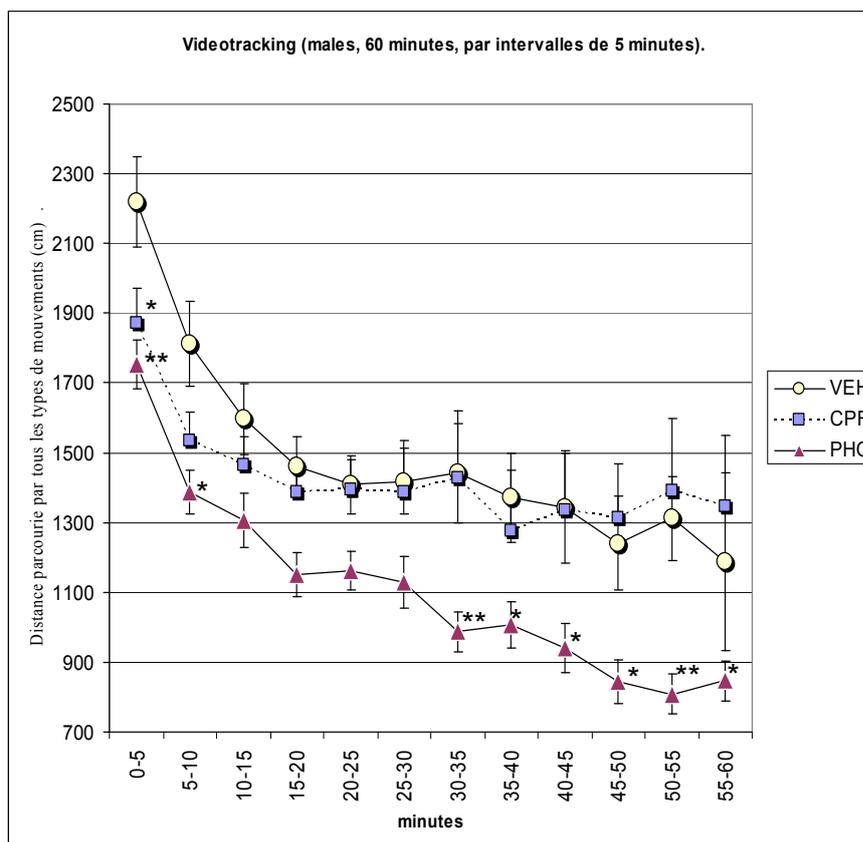


Figure 2.12 : Vidéotracking. Evolution en fonction du temps (60 minutes) de la distance en cm (Moyenne \pm ESM) parcourue par les mâles et pour tous les types de mouvements, présentée par intervalles de 5 minutes.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$ dans LSD de Fischer.

VEH: $n=20$; CPF: $n=19$; PHO: $n=19$.

Aussi, la moyenne d'activité locomotrice des souris mâles exposées au PHO reste, quelque soit l'intervalle de 5 minutes choisi durant cette heure de test, en dessous de la moyenne des souris VEH.

Par contre, la moyenne de la distance parcourue par les animaux exposés au CPF n'est plus basse de celle du groupe VEH que dans les premières minutes. Le résultat significatif de

l'ANOVA répétée concernant ces distances par intervalle de 5 minutes nous permet de comparer les moyennes par un LSD de FISHER (Tableau 2.1).

Test Post Hoc LSD de Fisher : Probabilités des Tests		
(ANOVA générale : $F(2, 55)=4,2292$, $p=0,0196$)		
Intervalle de temps (min)	CPF vs VEH	PHO vs VEH
0-5 min	0,0474*	0,0079*
5-10 min	0,1117	0,0152*
10-15 min	0,4516	0,0935
15-20 min	0,6708	0,0758
20-25 min	0,9381	0,1556
25-30 min	0,8505	0,0951
30-35 min	0,9373	0,0094*
35-40 min	0,5905	0,0373*
40-45 min	0,9746	0,0213*
45-50 min	0,6748	0,0230*
50-55 min	0,6429	0,0042*
55-60 min	0,3630	0,0494*

Tableau 2.1 : Comparaison de l'activité des mâles par 5 minutes : résultats du test statistique post Hoc LSD de Fischer. Comparaison des moyennes des distances parcourues par les mâles décomposées par intervalles de 5 minutes. * $p<0,05$ significatif

Les souris mâles exposées au CPF présentent une activité significativement plus basse que celle des souris mâles VEH, uniquement durant la période des 5 premières minutes de test, alors que l'activité des souris mâles exposées à la PHO reste significativement plus basse que celle des VEH durant la plupart des intervalles de temps sur une heures de test.

Comme nous pouvons l'observer à la figure 2.13, la distance parcourue dans l'« *open field* » durant les 10 premières minutes est plus basse (en moyenne) chez les souris mâles exposées aux OP (CPF : 3410 ± 40 cm; PHO : 3142 ± 29 cm) que chez les souris mâles VEH ($4032 \pm 54,33$ cm).

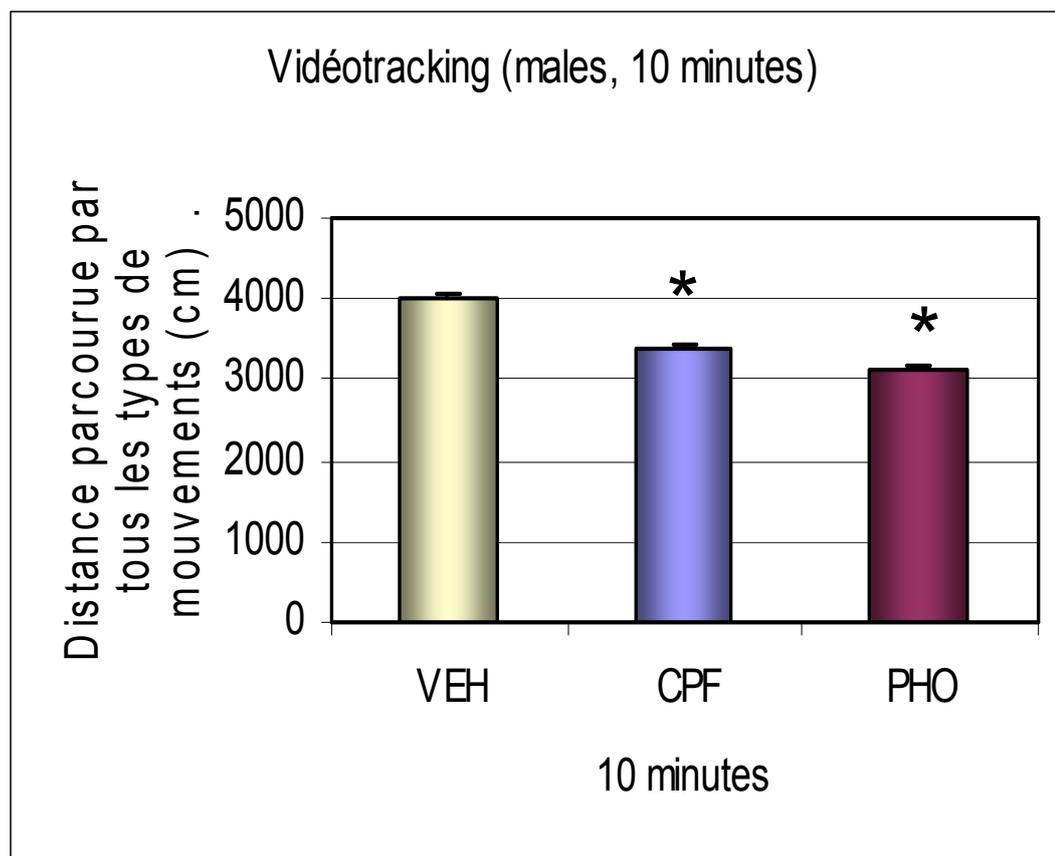


Figure 2.13 : Vidéotracking. Distance (Moyenne \pm ESM) parcourue par les souris mâles pour tous les types de mouvements durant les 10 premières minutes.

VEH: n=20; CPF: n=19; PHO: n=19.

*** p<0,05 ; **p<0,01**

L'ANOVA globale détermine une différence significative entre les distances parcourues par les souris mâles appartenant aux trois groupes d'exposition pour ces 10 premières minutes : $F(2, 55) = 5,8758$, $p=0,0049$. Le test de Dunnett confirme que chacun des groupes d'exposition aux insecticides (CPF et PHO) ont une moyenne significativement plus basse que celle des animaux non exposés (VEH) : CPF<VEH : $p=0,0218$ et PHO<VEH : $p=0,0015$.

En conclusion, l'analyse statistique de ces mesures nous permet de déterminer une diminution significative de l'activité motrice chez les souris des deux groupes d'exposition aux OP, lorsque la mesure est faite sur 10 minutes. Pour un temps de mesure plus long, soit 60 minutes, la diminution du niveau d'activité locomotrice spontanée n'est plus significative que chez les souris mâles exposées à la PHO (et non au CPF).

L'analyse spécifique des mesures de la distance parcourue uniquement sous forme de grands mouvements (> 20 cm) pourrait nous donner une évaluation du niveau d'activité locomotrice de type similaire à celle mesurée par l'appareil d'actométrie présenté précédemment et qui ne tenait compte que de grands mouvements également. La distance parcourue sous forme de grands mouvements durant 60 minutes par les souris mâles exposées à la PHO (1223 ± 59 cm) et non par celles exposées au CPF (3541 ± 259 cm) est significativement plus basse que celle du groupe VEH (3611 ± 194 cm) : Dunnett PHO<VEH : $p=0,0429$; CPF : $p=0,6414$).

La distance parcourue durant les 10 premières minutes sous forme de grands mouvements est significativement plus basse chez les animaux exposés au CPF (644 ± 25) ou exposés à la PHO (450 ± 20 cm) par rapport à celle parcourue par les souris mâles non exposées (VEH : 1081 ± 40) : Dunnett CPF<VEH : $p=0,0218$ et PHO< VEH : $p=0,0014$). Cela nous renseigne de nouveau sur le caractère temporel de l'hypoactivité dans lequel la PHO s'avère rendre les animaux hypoactifs très longtemps dans un nouvel espace ouvert alors que l'hypoactivité associée au CPF semble plus temporaire.

2.4.2 MÉMOIRE ET APPRENTISSAGE.

2.4.2.1 Etude de la mémoire et de l'apprentissage dans le labyrinthe de Lashley III

Les résultats de l'étude de la mémoire et de l'apprentissage sont présentés en trois parties : l'analyse de la période d'apprentissage, l'analyse des changements survenus après la rotation de 180° du labyrinthe et enfin l'analyse des changements mesurés après l'inversion du labyrinthe.

Analyse de la période d'apprentissage.

Rappelons que la première phase d'apprentissage est décomposée en 9 sessions successives survenant une fois par jour et que, durant cette phase, les animaux de chaque groupe d'exposition (un groupe de souris exposées au chlorpyrifos : CPF, n= 10 mâles et n=10 femelles, un groupe de souris exposées à la phosalone : PHO, n= 10 mâles et 10 femelles et un groupe de souris non exposées : VEH, n= 10 mâles et 10 femelles) apprennent à parcourir le labyrinthe depuis la chambre de départ jusqu'à la chambre d'arrivée, le plus vite possible et par le chemin le plus court (c'est-à-dire avec le moins d'erreurs possible). Le but de cette phase est de mesurer les capacités d'apprentissage de chacun des groupes afin de déterminer un éventuel effet développemental des OP à ce niveau (voir Chapitre 2.3.3.2).

Si l'index d'apprentissage (LI) reflète le niveau de réussite lors du parcours du labyrinthe, son évolution nous permet de mesurer les capacités d'apprentissage de chacun des groupes durant cette phase.

Nous observons que le LI augmente progressivement au cours des sessions (L2 à L10) pour tous les groupes d'exposition pour atteindre lors de la dernière session (L10) des valeurs proches de 1. Tous les animaux atteignent donc un niveau relativement similaire d'apprentissage. Ils apprennent donc tous (figure 2.14.A).

L'ANOVA répétée du LI en fonction des jours (facteur 'jour') d'apprentissage (9 jours : L2-L10), tenant en compte le groupe d'exposition (facteur 'groupe') et le sexe (facteur 'sexe') des animaux confirme l'évolution croissante du LI ($p < 0,0001$) et pour cette évolution une différence entre sexes : 'sexe x jour': $F(8, 416) = 2,6543$; $p = 0,0075$. Cette différence significative confirme qu'il est intéressant également de présenter les résultats des souris mâles et femelles séparément afin de réduire la variance non liée au type d'exposition et de mieux déceler ainsi les effets des insecticides pour les souris de chaque sexe.

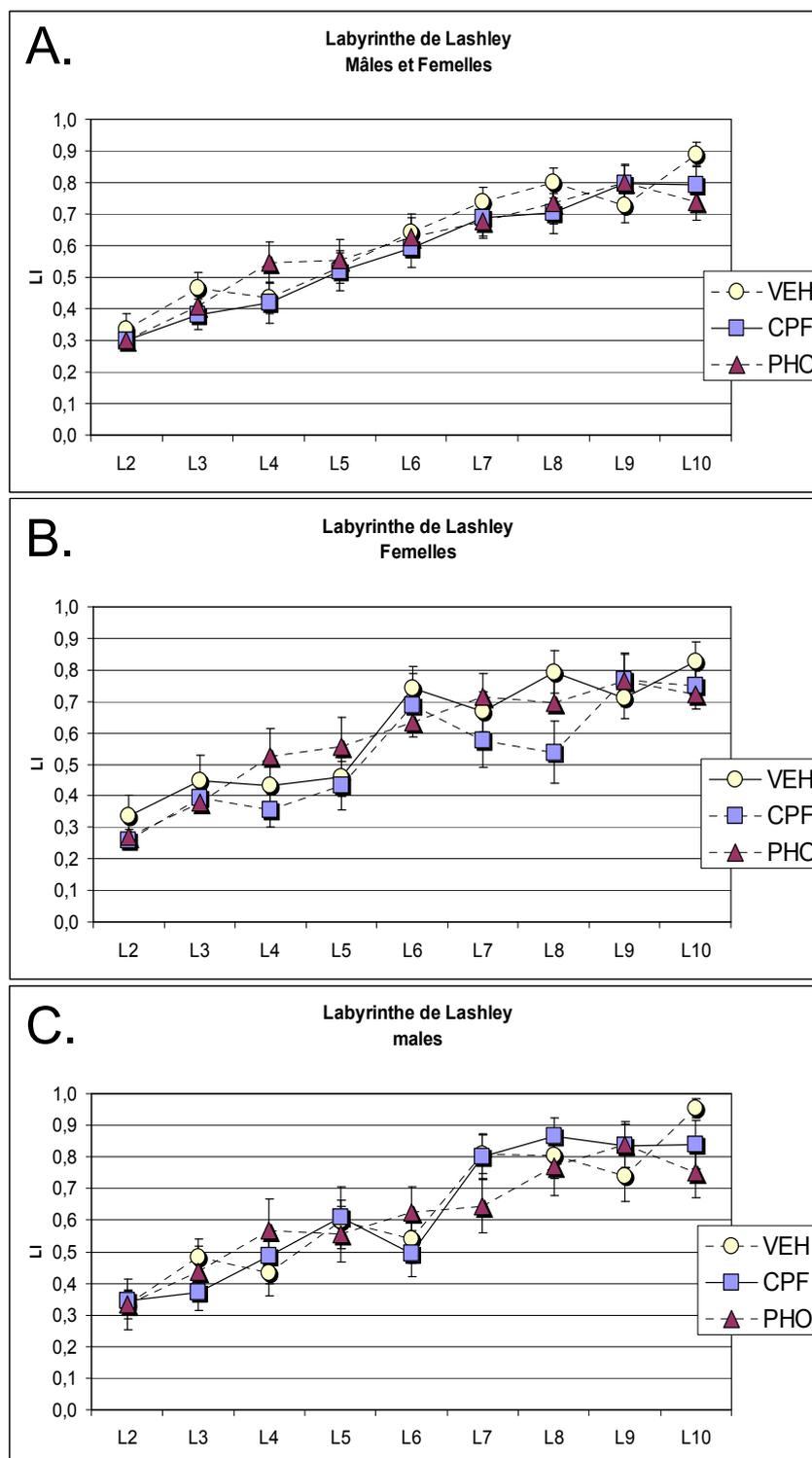


Figure 2.14 : Labyrinthe de Lashley : évolution de l'index d'apprentissage durant les 9 sessions de la première phase d'apprentissage (L2 à L10), représenté sous forme de moyenne \pm ESM pour les souris non exposées (VEH) et pour les souris exposées au chlorpyrifos (CPF) et à la phosalone (PHO), chez mâles et femelles (A); chez les femelles uniquement (B) et chez les mâles uniquement (C).

Une analyse statistique ANOVA des index d'apprentissage le dernier jour de la session d'apprentissage (L10) montre qu'il n'existe pas de différence significative entre groupes d'exposition quelque soit le sexe des souris (Voir tableau 2.2). Tous les animaux apprennent donc le labyrinthe. Nous pouvons relever une petite tendance à un apprentissage un peu moins performant des souris mâles exposées à la PHO.

LSD Fisher	
femelles	VEH
CPF	p= 0,7355
PHO	p= 0,3934
mâles	VEH
CPF	p= 0,3299
PHO	p= 0,0920

Tableau 2.2: résultats de la comparaison statistique (LSD de Fisher) des moyennes des index d'apprentissage (LI) des souris exposées au chlorpyrifos (CPF) et à la phosalone (PHO) par rapport aux souris non exposées (VEH).

Etude des effets de la rotation.

Les résultats de l'index d'apprentissage (LI) de la dernière session avant la rotation (L10) et de la première session après rotation (ROT1) sont présentés à la figure 2.15. Si l'on compare l'index d'apprentissage obtenu par les souris avant (L10) et après (ROT1) la rotation de 180° du labyrinthe, on observe en général une légère diminution des moyennes, sauf pour les souris mâles non exposées (VEH) chez qui l'index d'apprentissage (LI) diminue plus fortement après rotation.

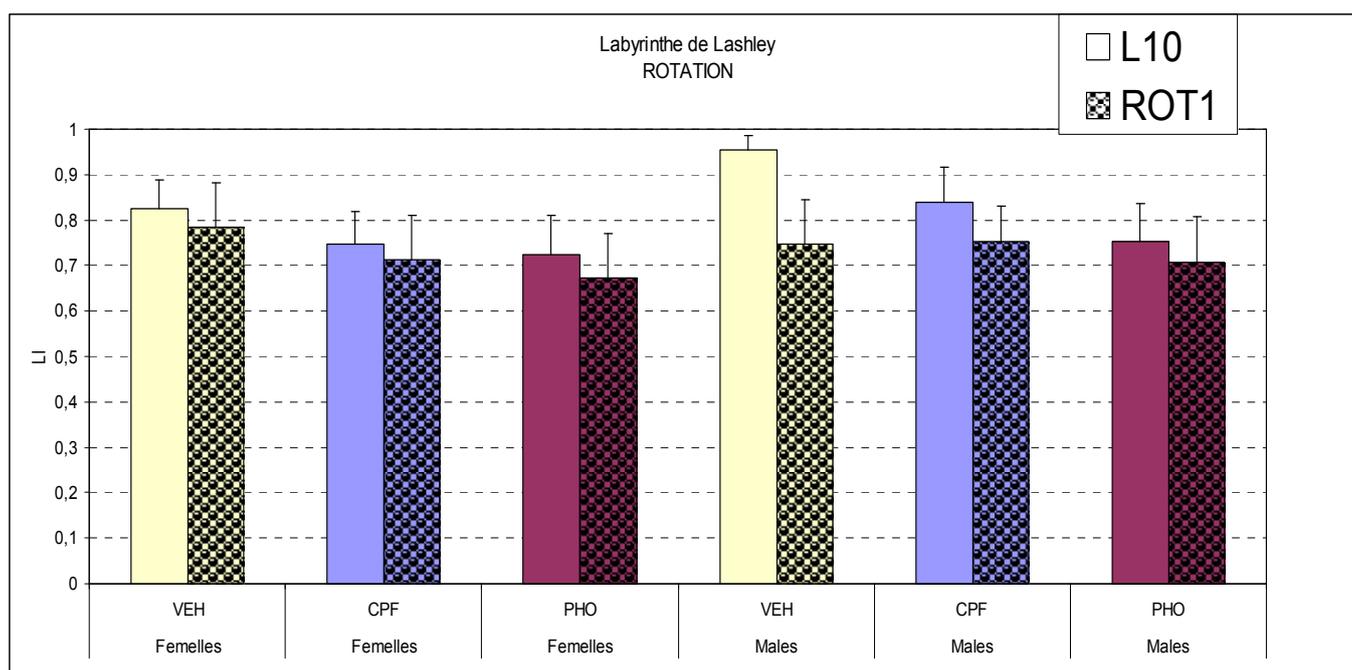


Figure 2.15 : Labyrinthe de Lashley. Index d'apprentissage (LI) (Moyenne \pm ESM) des souris mâles et femelles exposées au chlorpyrifos (CPF) et à la phosalone (PHO) ainsi que des animaux non exposés (VEH), mesurés avant (session 'L10') et après la rotation (session 'ROT1'). * $p < 0,05$.

Une ANOVA répétée détermine en effet une diminution générale des moyennes lors de la rotation ($F(1, 53) = 4,2529$; $p = 0,0441$). Un LSD de Fisher nous permet de comparer pour chacun des groupes d'exposition et pour chaque sexe les variations de l'index mesuré après rotation (tableau 2.3). Le LSD de FISHER détermine une diminution significative uniquement chez les souris mâles non exposées aux insecticides.

Evolution après rotation		
LSD de Fisher : p=		
groupes	femelles	mâles
VEH	0,6877	0,0421
CPF	0,4434	0,3998
PHO	0,6174	0,6572

Tableau 2.3: LSD de Fisher comparant les moyennes des LI avant et après la rotation pour les souris des deux sexes dans le labyrinthe de Lashley

En conclusion, si la rotation du labyrinthe de Lashley ne change pas le parcours du labyrinthe et ne fait qu'inverser les critères visuels externes, nous pouvons suggérer que premièrement, seuls les souris mâles semblent tenir compte des critères externes dans l'apprentissage du parcours, et que deuxièmement, les souris mâles exposées aux insecticides semblent ne pas utiliser les critères externes. L'exposition au CPF ou à la PHO perturberaient donc la stratégie d'apprentissage des souris CD1 mâles dans le labyrinthe de Lashley.

Etude des effets de l'inversion.

Dans un premier temps, nous allons analyser l'index d'apprentissage qui prend en compte les erreurs en T mais aussi les autres types d'erreur. Ensuite nous nous intéresserons aux erreurs en T qui ciblent plus spécifiquement la mémoire de travail.

Evolution de l'index d'apprentissage après l'inversion.

La figure 2.16 montre l'évolution de l'index d'apprentissage (LI) après inversion du labyrinthe pour les souris de chaque sexe et de chaque groupe d'exposition. Les souris de tous les groupes d'exposition présentent un index d'apprentissage plus bas après l'inversion du labyrinthe. Cependant, cette diminution nous paraît moins grande chez les souris femelles exposées au CPF et à la PHO par rapport aux souris femelles contrôles (VEH), et nous semble également moins grande chez les souris mâles exposées à la PHO par rapport à l'évolution de leurs contrôles (VEH).

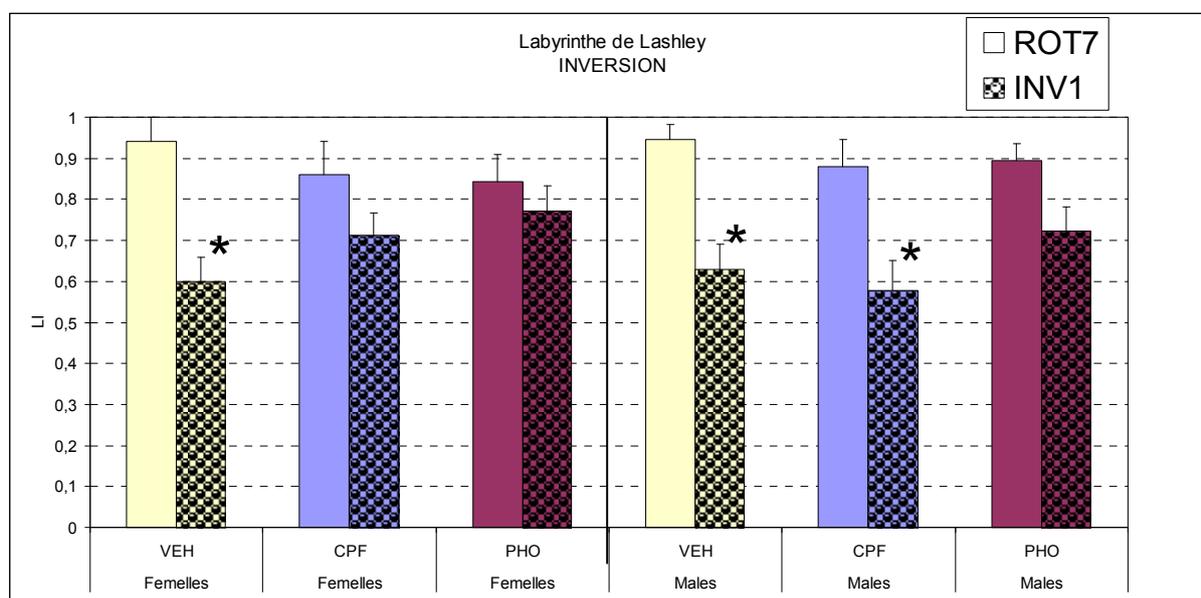


Figure 2.16: Labyrinthe de Lashley. Représentation de l'index d'apprentissage (LI) (Moyenne \pm ESM), avant et après inversion du labyrinthe, pour les souris des trois groupes d'exposition et pour les mâles et femelles séparément. (* : $p < 0,05$).

Evolution après inversion		
HSD de Tukey		
p=	Femelles	Males
VEH	0,0122	0,0257
CPF	0,3643	0,0400
PHO	0,9994	0,7555

Tableau 2.4: Analyse statistique des LI avant et après inversion du labyrinthe de Lashley. Comparaison des moyennes de LI en fonction du groupe d'exposition et du sexe.

Nous avons réalisé une ANOVA répétée pour comparer la moyenne avant et après retournement pour chacun des groupes d'exposition et pour chaque sexe. Les résultats de cette analyse statistique HSD le Tukey sont présentés dans le tableau ci-dessus (tableau 2.4.). Tant les souris femelles que les souris mâles non exposées présentent une diminution significative de LI après l'inversion (respectivement $p = 0,0122$ et $0,0257$), ce qui détermine d'une part que leur mémoire spatiale est performante et d'autre part que le test utilisé est fonctionnel. En examinant les LI des animaux exposés ; nous constatons que chez les souris femelles, l'index d'apprentissage ne diminue significativement pas après l'inversion ni pour les animaux exposés au CPF (HSD Tukey : $p=0,3643$), ni pour les animaux exposés au PHO (HSD Tukey : $p=0,9994$). Nous constatons également que chez les souris mâles, seuls les animaux exposés au PHO (HSD Tukey : $p = 0,7555$) ne présentent pas une diminution de LI après inversion.

Dans la mesure où cette inversion du labyrinthe perturbe le chemin normal appris auparavant par les souris, des erreurs doivent survenir et une diminution du LI est attendue à condition que la mémoire des souris soit performante. Au contraire, si la diminution du LI est faible après inversion, cela est signe d'une mémoire moins performante.

Nous pouvons donc conclure que les souris femelles exposées au CPF et à la PHO, ainsi que les souris mâles exposées au PHO auraient une mémoire spatiale de travail moins performante que leurs contrôles respectifs. Autrement dit, ces résultats suggèrent que le CPF altère la mémoire spatiale des souris femelles et que le PHO perturbe la mémoire des souris femelles et mâles.

Evolution des « erreurs en T » après inversion du labyrinthe.

L'analyse de l'évolution de l'index d'apprentissage avant et après inversion du labyrinthe (qui ne modifie que les T) nous donne des renseignements intéressants sur l'état de la mémoire de travail des souris. Néanmoins, l'index d'apprentissage tient également compte d'une certaine manière de toutes les perturbations ressenties par les souris lors de l'inversion : le nombre d'erreurs en T et en cul-de-sac ainsi que les retours en arrière. Si lors de l'inversion du labyrinthe, seul le sens des T est inversé, l'analyse du nombre d'erreurs en T seul pourrait nous offrir plus de précision quant au type de mémoire altérée que l'index d'apprentissage

Les femelles et les mâles témoins, comme les exposés au CPF ou à la PHO présentent un taux de réussite des T proche de 100% avant l'inversion du labyrinthe (ROT7) (figure 2.17). Une diminution de la moyenne du taux de réussite dans les T après l'inversion du labyrinthe est observée dans tous les groupes, mais cette évolution apparaît moins importante chez les femelles et mâles exposés à la PHO.

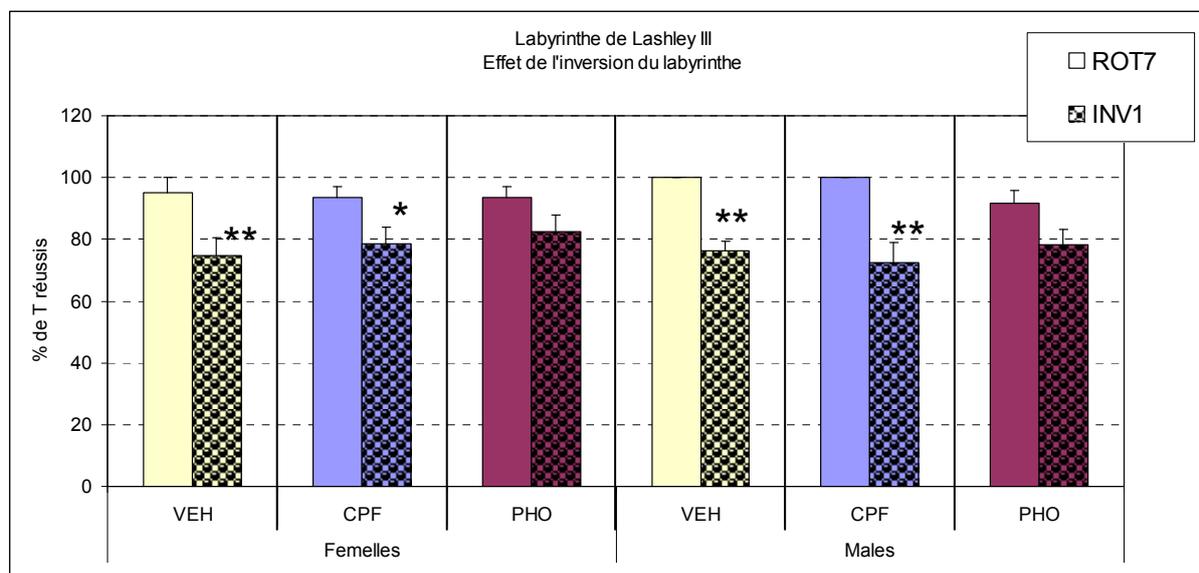


Figure 2.19: Taux de réussite des T (% de T réussis) dans le labyrinthe de Lashley avant l'inversion (ROT7) et après l'inversion du labyrinthe (INV1) ; présenté sous forme de moyenne \pm ESM pour les animaux témoins (VEH), les animaux exposés au chlorpyrifos (CPF) et les animaux exposés à la phosalone (PHO) chez les deux sexes séparément. * : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$ déterminent des différences significatives par rapport aux témoins respectifs.

L'ANOVA factorielle répétée définit un effet significatif de l'inversion pour le % de réussite des T : $F(1, 53)=45,349$, $p<0,0001$. Le test post hoc LSD de Fisher (tableau 2.5) nous renseigne sur la différence du taux de réussite dans les T avant et après inversion du labyrinthe, pour chacun des groupes d'exposition, chez les souris femelles et mâles testées.

Evolution après inversion		
LSD Fisher		
p=	femelles	mâles
VEH	0,0039	0,0007
CPF	0,0275	0,0001
PHO	0,1039	0,0625

Tableau 2.5: Résultats du test post hoc LSD de FISHER pour la comparaison du % de réussite dans les T avant et après l'inversion du labyrinthe chez les souris mâles et femelles exposées au chlorpyrifos (CPF), à la phosalone (PHO) et non exposées (VEH).

Le taux de réussite dans les T est significativement réduit après inversion du labyrinthe chez les souris femelles contrôles (VEH). Cela confirme que la mémoire de travail de ces animaux était performante pour apprendre le labyrinthe. Il en va de même pour le groupe de femelles exposées au CPF. Le CPF n'a donc pas significativement altéré la mémoire de travail de ces souris femelles. Par contre, le % de réussite des femelles exposées à la PHO ne diminue pas de manière significative. Ce résultat suggère que la PHO, et non le CPF, altère de manière significative la mémoire spatiale de travail des souris femelles dans le labyrinthe de Lashley. Le taux de réussite dans les T des souris mâles de tous les groupes d'exposition diminue après l'inversion du labyrinthe. Toutefois, cette diminution n'est significative que pour les souris mâles non exposées (VEH) et les souris mâles exposées au CPF, et pas pour les souris mâles exposées à la PHO. Ces résultats statistiques issus du test LSD de FISHER suggèrent que la PHO et non le CPF altérerait la mémoire de travail des souris mâles.

Donc, la PHO altérerait la mémoire spatiale de travail des souris femelles, et dans une moindre mesure celle des souris mâles. Le CPF perturberait la mémoire spatiale de travail des souris femelles et pas celle des souris mâles. Ces effets d'altération seraient produits de manière plus intense par la PHO que par le CPF.

2.4.2.2 Etude de la mémoire dans le labyrinthe en T: alternance spontanée.

L'évaluation de l'alternance spontanée se détermine par le pourcentage d'alternance qui survient d'un essai à l'autre pour 14 essais successifs [% d'alternance = (nombre d'alternance/13) x 100].

Pour des raisons pratiques, le test n'a été réalisé qu'avec des souris mâles, et ceci pour les trois groupes d'exposition (VEH, CPF et PHO).

La moyenne du % d'alternance (figure 2.18) des souris mâles non exposées (VEH : $74,61 \pm 3,64$ %) et exposées au PHO ($74,08 \pm 3,49$ %) sont très proches, alors que celle des souris exposées au CPF est plus basse ($61,54 \pm 4,13$ %) que celles des deux autres groupes.

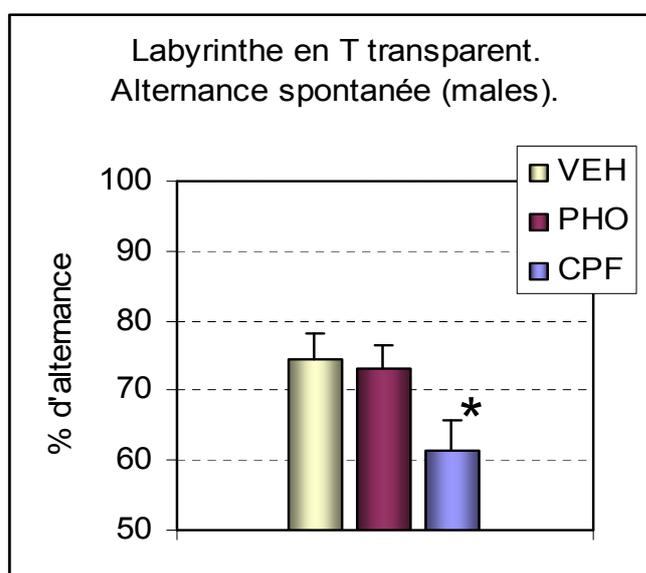


Figure 2.18 : le % d'alternance (Moyenne ± ESM) réalisé par les souris mâles exposées au chlorpyrifos (CPF), à la phosalone (PHO) et souris non exposées (VEH) dans le labyrinthe en T transparent. n=10 par groupe d'exposition. (* p<0,05)

L'ANOVA factorielle du % d'alternance détermine une différence significative entre groupes d'exposition : $F(2, 27)=3,6084$, $p=0,0409$. Le test de Dunnett précise que le % d'alternance est plus bas chez le groupe de souris exposées au CPF que chez les souris non exposées (VEH) : $p=0,0191$, alors que ce n'est pas le cas pour les souris exposées au PHO : $p=0,5465$. Nous suggérons donc que l'exposition au CPF (et non celle à la PHO) diminue le niveau de l'alternance spontanée chez les souris mâles. Si, comme nous avons dit plus haut, la qualité de la mémoire spatiale est impliquée dans le niveau d'alternance spontanée, nous pouvons en conclure que par ce test, nous détectons un effet d'altération de la mémoire des souris mâles par le CPF (et non par la PHO).

2.4.3 ANXIÉTÉ ET DÉPRESSION

2.4.3.1 Mesure de l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé.

Mesure chez les souris femelles

Rappelons que la proportion de temps passé par les souris dans les bras ouverts est considérée comme étant inversement proportionnelle au niveau d'anxiété. Le % de temps passé dans les bras ouverts (voir figure 2.19.A.) mesuré pendant 5 minutes dans le labyrinthe en croix surélevé (EPM) paraît plus bas en moyenne chez les souris femelles exposées au CPF ($31,80 \pm 1,59$ %) et à la phosalone ($35,00 \pm 2,40$ %) que chez les souris femelles non exposées ($42,25 \pm 3,85$ %). L'ANOVA générale détecte une différence significative entre groupes pour ce critère ($F(2, 25)=3,9503$, $p=0,0323$). Selon le test Dunnett, la moyenne des femelles exposées à la PHO est plus basse que celle des non exposées d'une manière presque significative ($p=0,0589$) et celle des souris femelles exposées au CPF est très significativement plus basse que celle des souris non exposées ($p=0,0097$).

Rappelons que le nombre de « *head-dipping* » (HD) réalisé dans l'EPM durant les 5 minutes de test est une mesure comportementale dont la grandeur est inversement proportionnelle au niveau d'anxiété des souris (voir figure 2.19.B.). La moyenne du nombre de HD réalisés par les souris femelles non exposées ($31,38 \pm 5,10$) est mesurée plus haute que celle des souris femelles exposées au CPF ($20,00 \pm 2,22$) ou à la PHO ($19,50 \pm 2,47$). L'ANOVA confirme qu'il existe bien une différence significative entre groupes : $F(2, 25)=3,9522$; $p=0,0322$ et le test de Dunnett précise que le nombre de HD est significativement plus grand chez le groupe VEH que celui du groupe CPF ($p=0,0212$) et que celui répertorié pour le groupe PHO ($p=0,0168$).

Le nombre de passages au centre peut nous apporter une information sur le niveau d'activité tant que nous renseignons sur le niveau d'anxiété des souris. Ce critère doit donc être appuyé par les mesures de l'activité locomotrice spontanée afin de fournir un éventuel renseignement à propos du niveau d'anxiété des souris.

Si la moyenne du nombre de passages au centre réalisés par les souris femelles dans l'EPM (voir figure 2.19.C) est observée légèrement plus basse chez celles exposées au CPF ($39,00 \pm 1,45$) et à la PHO ($37,00 \pm 2,00$) que chez les femelles non exposées ($41,00 \pm 2,32$), l'ANOVA générale détermine cependant qu'il n'existe pas de différence significative pour ce critère entre groupes d'exposition chez les souris femelles ($F(2, 25)=1,0480$, $p=0,3656$). Le

test de Dunnett confirme que ni la moyenne du nombre de passages au centre du groupe CPF ($p=0,3676$), ni la celle du groupe PHO ($p=0,1376$) n'est significativement plus basse que celle du groupe VEH chez les femelles.

Mesure chez les souris mâles.

La moyenne du % de temps passé dans les bras ouverts durant les 5 minutes du temps de test dans l'EPM (figure 2.19 A) est similaire que ce soit chez les souris non exposées ($41,00 \pm 2,74$ %) ou chez les souris exposées au CPF ($39,17 \pm 2,43$ %) ou à la PHO ($40,37 \pm 4,09$ %). L'ANOVA générale pour ce critère confirme l'hypothèse qu'il n'y a pas de différence entre groupes ($F(2, 25)=0,0839$, $p=0,9198$).

Le nombre de HD réalisés par les souris mâles (figure 2.19.B) semble très proche quelque soit le groupe d'exposition (CPF : $20,90 \pm 2,74$; PHO : $20,10 \pm 3,37$; VEH : $23,13 \pm 5,27$). L'ANOVA détermine en effet qu'il n'existe pas de différence significative entre groupes d'exposition pour cette mesure comportementale : $F(2, 25)=0,0857$, $p=0,9182$.

Le nombre total de passages au centre réalisés par les souris mâles exposées au CPF ($36,40 \pm 1,94$) ou à la PHO ($36,80 \pm 2,85$) est compté un peu plus bas que celui présenté par les souris mâles non exposées ($42,00 \pm 2,52$) (figure 2.19.C). L'ANOVA factorielle comparant les moyennes du nombre de passages réalisés par les souris mâles détermine qu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes d'exposition ($F(2, 25)=1,4676$; $p=0,2496$). L'hypothèse selon laquelle la moyenne des souris de chacun des groupes d'exposition aux OP est significativement plus basse que celle des souris non exposées est refusée dans les deux cas ; il ne s'agit que d'une petite tendance à une plus basse valeur (CPF<VEH : $p=0,1130$; PHO<VEH : $p=0,1360$).

Conclusion

Selon les critères de mesure d'anxiété, à la fois le % de temps passé dans les bras ouverts et le nombre de « head-dipping » réalisés durant les 5 minutes de test dans l'EPM, les souris femelles exposées aux OP présentent un niveau d'anxiété plus élevé que les souris non exposées. Cela suggère que l'exposition à chacun de ces deux OP organiserait un effet développemental persistant à l'âge adulte, se traduisant par une augmentation du niveau de l'anxiété des souris femelles CD1. Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle perturbation du niveau d'anxiété chez les souris mâles dans ce test, que ce soit pour l'exposition au CPF ou à la PHO.

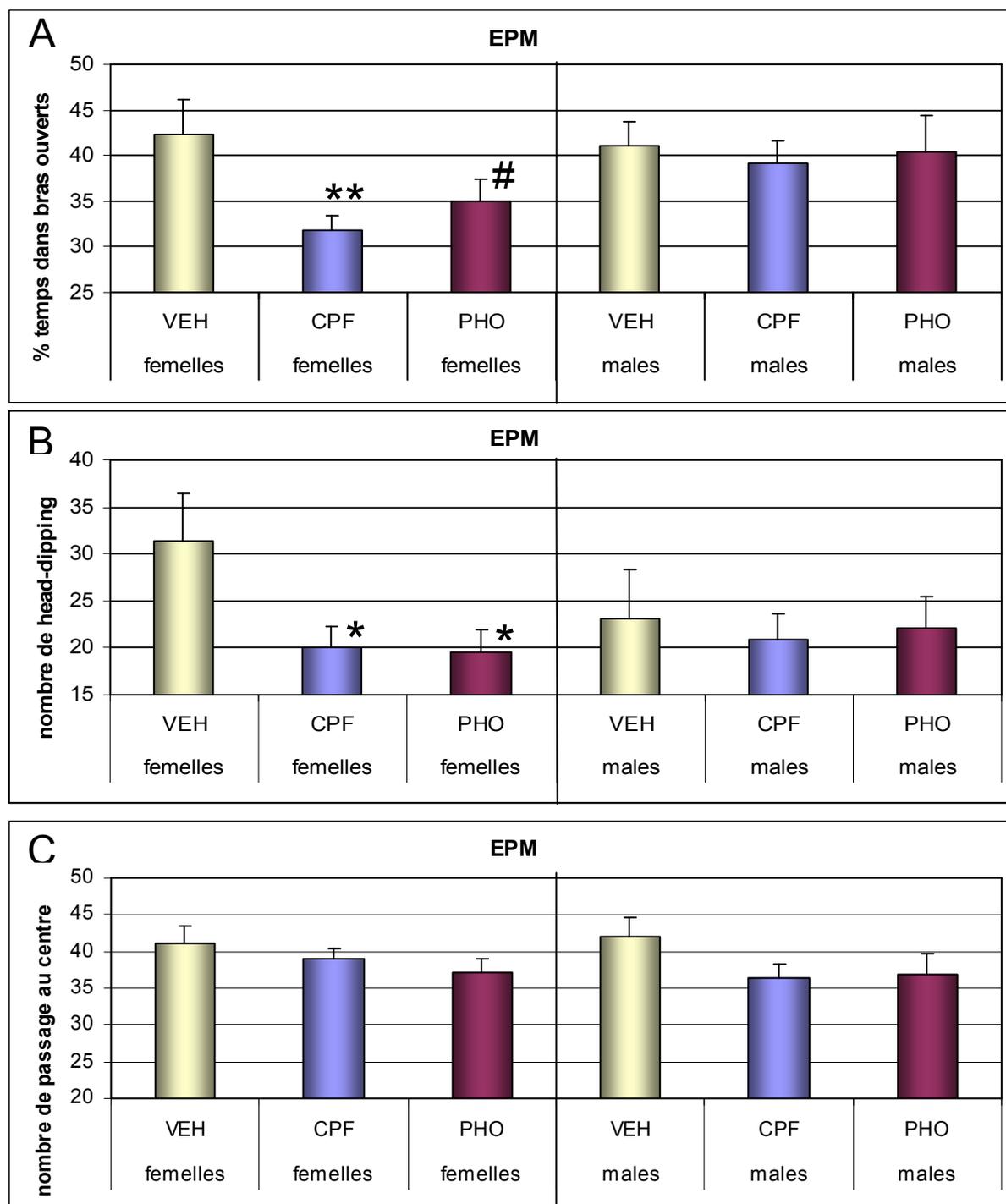


Figure 2.19 : EPM (5minutes). % du temps passé dans les bras ouverts (A), nombre de Head-Dipping (B) et nombre de passages au centre (C) réalisés en moyenne (\pm SEM) par le groupe de souris exposées à 5 mg/kg.jour de CPF (groupe CPF ; n=10 par sexe), par le groupe de souris exposées à la phosalone (groupe PHO ; n=10 par sexe) et par le groupe de souris non exposées (groupe VEH ; n=8 par sexe).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p = 0,05$

2.4.3.2 Mesure de l'anxiété dans le « *Light/dark box test* ».

Mesure chez les souris femelles

Le % de temps passé par les souris dans la chambre sombre durant les 5 minutes de test dans le « *Light/dark box* » (voir figure 2.20.A) est en moyenne plus élevé chez les souris femelles exposées au CPF ($55,30 \pm 4,93\%$) et à la PHO ($50,50 \pm 4,27\%$) que chez les souris femelles non exposées ($38,97 \pm 1,59\%$).

Une ANOVA générale comparant les moyennes du % de temps passé dans la chambre sombre par les souris femelles détermine une différence significative entre groupes d'exposition ($F(2, 27)=5,2130$; $p=0,0122$). Le test de Dunnett nous permet de préciser que la moyenne du groupe des souris femelles exposées au CPF ou du groupe de souris femelles exposées à la PHO est significativement plus grande que la moyenne des souris du groupe contrôle (CPF>VEH : $p=0,0039$; PHO>VEH : $p=0,0319$).

Les souris femelles exposées au CPF et à la PHO présentent en moyenne un nombre de passages ou de transitions entre les différents compartiments (voir figure 2.20.B) moins élevé (respectivement : $25,50 \pm 3,17$ et $19,10 \pm 1,66$) que les souris femelles non exposées à ces OP (VEH : $31,20 \pm 2,06$).

L'ANOVA factorielle concernant cette mesure détermine une différence significative entre les trois groupes d'exposition : $F(2, 27)=6,4538$; $p=0,0051$. Le test de Dunnett nous permet de déterminer que la moyenne des transitions des souris femelles exposées à la PHO est significativement plus basse que celle des VEH ($p=0,0012$) ; par contre, seule une tendance à une plus basse moyenne des les souris exposées au CPF ($p=0,0889$) est déterminée comparée à celle des animaux VEH.

Mesure chez les souris mâles.

Les moyennes du % de temps passé dans la chambre sombre par les souris mâles exposées au CPF ($55,83 \pm 5,56\%$), par les souris mâles exposées à la PHO ($50,93 \pm 2,57\%$) et par les souris mâles non exposées ($55,13 \pm 5,93\%$) paraissent très semblables (Figure 2.20.A).

L'ANOVA factorielle ne détermine d'ailleurs pas de différence significative entre groupes d'exposition ($F(2, 27)=,4993$; $p=0,6124$). Le test de Dunnett confirme ces similitudes (CPF<>VEH : $p=0,8968$; PHO<>VEH : $p=0,7726$).

Les souris mâles présentent un nombre similaire de transitions entre les compartiments, qu'elles soient non exposées ($21,80 \pm 3,45$), exposées au CPF ($24,10 \pm 3,27$) ou exposées à la

PHO ($26,50 \pm 2,71$) (figure 2.20 B). Aucune différence significative n'est mise en évidence pour le nombre de transitions entre les trois groupes d'exposition par l'analyse statistique ANOVA ($F(2, 27)=0,5529$, $p=0,5816$). De même, le test Dunnett détermine qu'il n'y a pas de différence entre chacun des groupes d'exposition et le groupe VEH (CPF<VEH : $p=0,4496$; PHO<VEH : $p=0,2431$).

Conclusion

Ensemble, ces résultats déterminent une plus grande anxiété chez les souris femelles exposées au CPF et à la PHO par rapport aux femelles non exposées. Les deux OP produiraient donc une augmentation persistante de l'anxiété chez les souris femelles CD1. Par contre, aucun effet de ce type n'a été mis en évidence chez les souris mâles CD1 lors de ce test.

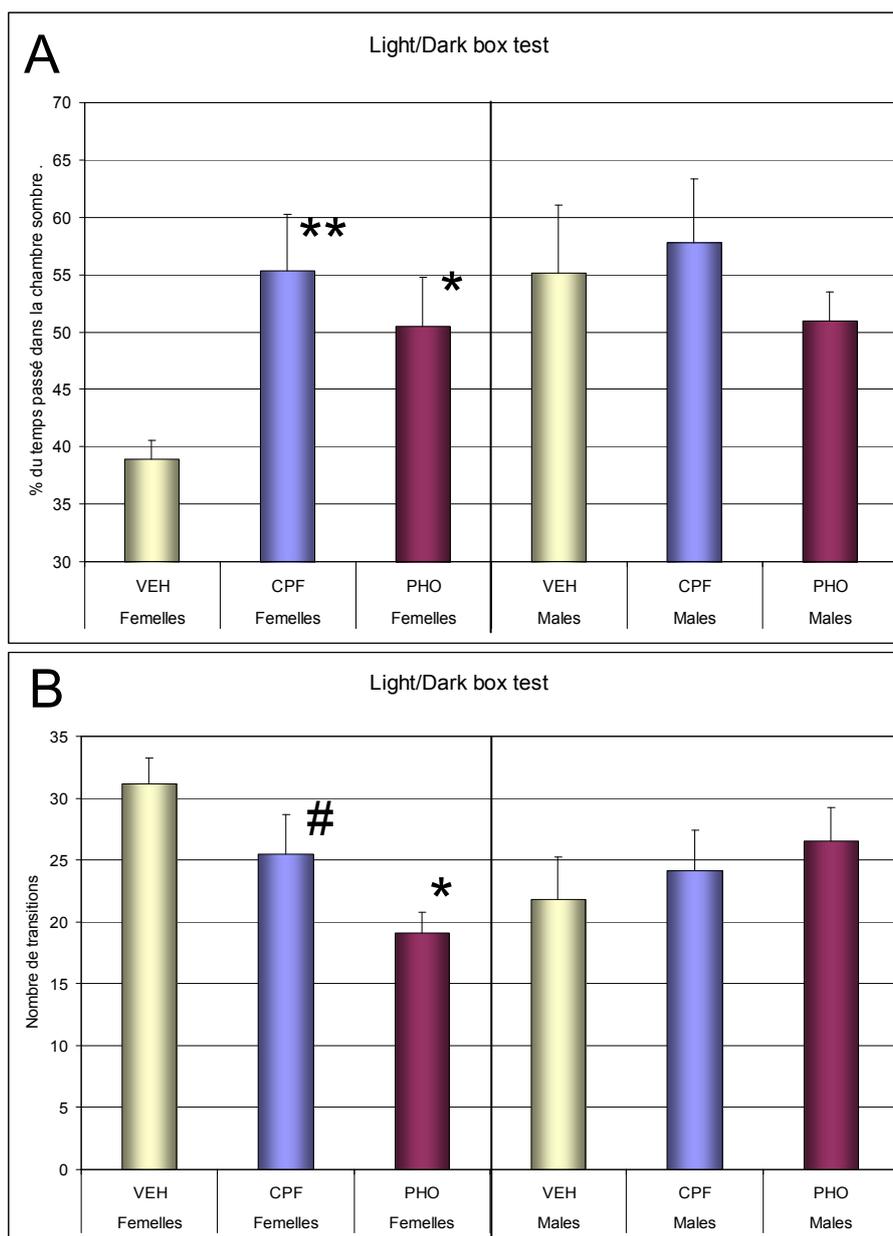


Figure 2.20: “Light/dark box test”. Représentation du % du temps passé dans le compartiment sombre ou « dark box » (A) et du nombre de transitions (B) (moyenne \pm ESM) réalisés par les souris non exposées aux insecticides OP (groupe VEH), par les souris exposées au chlorpyrifos (CPF) et à la phosalone (PHO).

n=10 par groupe et par sexe.

***p<0,05 ; **p<0,01 ; # p<0,10**

2.4.3.3 Mesure du niveau de dépression dans le test de nage forcée

Comme une augmentation du niveau d'anxiété n'a été déterminée que chez les souris femelles lors des tests précédents, et en fonction des moyens techniques dont nous disposons, nous avons décidé de déterminer le niveau de dépression uniquement pour les souris de ce sexe.

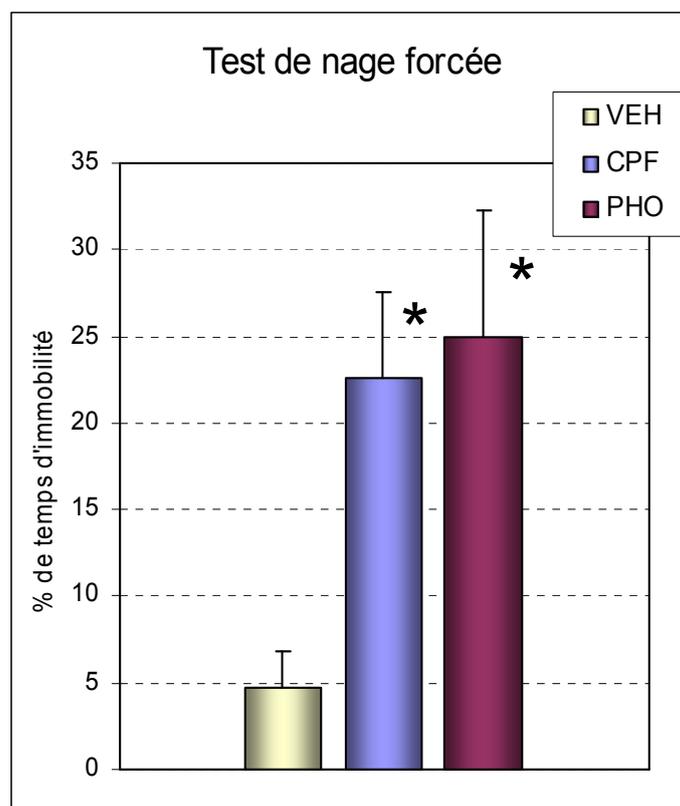


Figure 2.21. Temps d'immobilité (%) dans le test de nage forcée pour les souris femelles exposées au chlorpyrifos (CPF ; n=9), les souris femelles exposées à la phosalone (PHO, n=10) et pour les souris femelles non exposées (VEH, n=9). (Moyenne ± ESM). *p<0,05

Le % d'immobilité (figure 2.21) est plus important en moyenne pour les souris exposées au CPF (22,62 ± 9,95 %) et à la PHO (25,00 ± 7,24 %) que pour les souris VEH (4,78 ± 2,09 %) ; ces dernières nageant pratiquement durant toute la durée du test (10 minutes).

L'ANOVA détermine une différence significative entre la moyenne de % de temps d'immobilité réalisé par les souris des trois groupes d'exposition : $F(2, 26)=4,0841$, $p=0,0287$.

Le test statistique Dunnett confirme que la moyenne du % de temps d'immobilité des souris

de chacun des groupes d'exposition aux OP est bien significativement plus grande que celle du groupe VEH (CPF>VEH : $p=0,0258$; PHO>VEH $p=0,0130$).

En sachant que le % de temps d'immobilité durant ce test est proportionnel au niveau de dépression, nous suggérons que le CPF et la PHO ont créé un effet développemental d'augmentation du niveau d'anxiété chez les souris femelles CD1.

2.5 DISCUSSION.

Les résultats notre étude démontrent qu'une exposition chronique périnatale de type long à des OP en doses subtoxiques (ou « sub-clinique ») induit des altérations persistantes de l'activité et de la mémoire ainsi que des changements du niveau de l'anxiété et fait apparaître des signes de dépression chez la souris adulte. Nous devons ajouter que certains de ces troubles neurocomportementaux surviennent ou non selon le sexe de l'animal.

2.5.1 EFFETS SUR LE NIVEAU D'ACTIVITÉ.

Par une exposition longue allant de la fin de la gestation jusqu'à la fin de la seconde semaine postnatale, à 5 mg/kg une fois par jour, par voie orale comme route et avec l'huile de maïs comme véhicule, nous avons déterminé que le CPF et la PHO diminuent l'intensité de l'activité locomotrice spontanée chez la souris mâle, mais pas chez la souris femelle.

2.5.2 EFFETS COGNITIFS (mémoire et apprentissage).

Nous avons mis en évidence par une rotation de 180° du labyrinthe de Lashley, que le CPF et la PHO altèrent la stratégie d'apprentissage uniquement des souris mâles et non des souris femelles. Contrairement aux souris mâles non exposées, les souris mâles exposées aux insecticides n'utiliseraient pas les repères externes au labyrinthe pour mémoriser leur chemin, et auraient adopté une stratégie d'apprentissage qui ressemble à celle des souris femelles.

L'analyse des index d'apprentissage lors de l'inversion du labyrinthe de Lashley nous a permis de déterminer que le CPF altère la mémoire spatiale des souris femelles uniquement, et que la PHO altère la mémoire spatiale des souris des deux sexes. Toujours par l'inversion du labyrinthe de Lashley, mais par l'analyse du taux de réussite dans les T, nous avons déterminé que la PHO (et non le CPF) altère la mémoire spatiale de travail principalement chez les souris femelles. L'altération de la mémoire s'avère donc plus forte chez les souris femelles et pour la PHO.

Le CPF (mais pas la PHO) altère la mémoire de travail des souris mâles dans le test d'alternance spontanée du labyrinthe en T. Rappelons que ce test n'est réalisé que chez les souris de sexe mâle et ne peut donc nous offrir de renseignements sur le caractère lié au sexe dans l'occurrence des effets développementaux produits par ces insecticides.

Pour expliquer les différences dans les résultats d'altération de la mémoire spatiale des souris mâles en fonction du test réalisé, il faut souligner que les conditions de test de la mémoire de travail dans le labyrinthe de Lashley et dans le labyrinthe en T sont différentes. En effet, la mémoire de travail est associée à la récompense (de type alimentaire) dans le labyrinthe de Lashley, alors que ce n'est pas le cas dans le labyrinthe en T. En conséquence, la différence d'effets des OP obtenue par ces deux méthodes pourrait trouver son origine dans la présence ou l'absence de récompense alimentaire. Deuxièmement, la mémoire étudiée dans le Lashley est à long terme alors que celle étudiée dans le labyrinthe en T est à court terme.

2.5.3 EFFETS SUR LE NIVEAU D'ANXIÉTÉ.

Dans cette série d'expériences, l'effet de l'exposition subtoxique au CPF et à la PHO sur le niveau d'anxiété est également dépendant du sexe. En effet, nous avons démontré, quel que soit le test d'anxiété (labyrinthe en croix surélevé ou test chambre claire/sombre), que les deux OP augmentent le niveau d'anxiété des souris femelles. Nous n'avons pas détecté cet effet chez les souris mâles.

2.5.4 COMPARAISON DES EFFETS COMPORTEMENTAUX OBTENUS AVEC CEUX DÉCRITS DANS LA LITTÉRATURE.

Plusieurs équipes ont montré des altérations de l'activité suite à une exposition subtoxique périnatale au CPF. Comme dans l'expérience que nous avons réalisée ici, ce type d'effet développemental peut montrer un caractère dépendant du sexe et toucher plus particulièrement les animaux mâles si la période d'exposition est réalisée à un certain moment du développement. En effet, si le traitement est effectué au milieu de la période de gestation : GD9-12 (Icenogle *et al.*, 2004), l'altération de l'activité concerne les souris des deux sexes, alors que les périodes de traitements réalisées en fin de gestation (GD 17-20) (Levin *et al.*, 2002), en début de vie (PND 1-4) (Dam *et al.*, 2000) ou durant la deuxième semaine de vie (PND 11-14) (Dam *et al.*, 2000) ne touchent que les souris mâles.

Par contre, dans ces expériences, Icenogle, Levin et Dam, ont montré une hyperactivité chez les animaux adultes exposés au CPF quelque soit le test comportemental réalisé (T maze, Figure 8 maze, openfield) (Dam *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004).

Nous devons souligner que ces expériences sont réalisées chez le rat (alors que nous utilisons la souris), que la période d'exposition est de type court : 4 jours (alors que nous utilisons une

période longue), que le traitement se fait par voie sous-cutanée et directement chez le jeune lorsque l'exposition est périnatale (alors que nous exposons par la mère et par voie orale), et que le CPF est dilué dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) (alors que nous diluons directement le CPF dans l'huile de maïs et donc sans solvant).

Nous verrons plus loin ce qui dans ces différences de protocole pourrait expliquer ces différences de résultat.

La littérature a déterminé également qu'une exposition périnatale subtoxique au CPF peut perturber la mémoire, et cela de manière dépendante du sexe des animaux, et également en fonction du moment de l'exposition, comme c'est déjà le cas en ce qui concerne l'activité. En effet, les mémoires de référence et de travail des rats mâles et femelles sont altérées par une exposition subtoxique au CPF durant le milieu de la gestation (Icenogle *et al.*, 2004) alors que seuls les mâles sont concernés par cette altération lorsque le traitement est postnatal (Levin *et al.*, 2001; Aldridge *et al.*, 2005a). La mémoire des rats femelles est même légèrement améliorée dans le labyrinthe radial, de telle manière que la différence normale entre sexes n'est plus perceptible chez les rats exposés au CPF (Levin *et al.*, 2001). Ces résultats peuvent être rapprochés des nôtres. En effet, par la rotation du labyrinthe de Lashley, nous avons pu démontrer que les souris mâles témoins utilisaient les critères externes afin de mémoriser le bon chemin dans le labyrinthe alors que les souris femelles utilisaient une stratégie différente. Aussi, l'exposition au CPF paraît limiter l'utilisation de la mémoire spatiale (liée aux critères externes) chez les mâles et donc atténuer la différence de performance mnésique qui existait entre mâles et femelles. Nous suggérons que tant dans le labyrinthe radial utilisé par Levin et collaborateurs (Levin *et al.*, 2001), que dans le labyrinthe de Lashley lors de la rotation de celui-ci, le CPF altère la mémoire spatiale des souris mâles, et pas des souris femelles. La diminution du taux d'alternance spontanée provoquée par le CPF dans le test en T suggère la même conclusion. En effet, le labyrinthe en T est transparent et peut donc faire appel, en plus de la mémoire de travail, à l'utilisation des critères ou repères externes dans la mémorisation du chemin (Lalonde, 2002). Un autre résultat appuie cette suggestion : lorsque l'on analyse spécifiquement la mémoire de travail dans le labyrinthe de Lashley (% de réussite dans les T), lors de l'inversion du labyrinthe (ce qui ne modifie pas les critères externes), aucun effet du CPF n'est détecté chez les souris mâles. Le CPF altérerait la capacité des souris mâles à utiliser les critères externes pour s'orienter dans le labyrinthe.

Par contre, contrairement aux résultats obtenus à l'aide du labyrinthe radial par Levin et collaborateurs (Levin *et al.*, 2001), nos résultats montrent que le CPF altère la mémoire de travail (% de réussite dans les T lors de l'inversion du labyrinthe de Lashley).

De nouveau, nous suggérons que les différences dans le protocole d'exposition durant le développement et dans le modèle animal utilisé pourraient fournir une explication quant à ces différences dans les effets cognitifs obtenus.

Nous savons par la littérature que 4 jours d'exposition périnatale au CPF en dose subtoxique induisent différentes altérations du niveau d'anxiété chez les rongeurs adultes. Plus précisément, l'exposition au CPF durant le début de la vie diminue le niveau d'anxiété chez le rat de sexe mâle (Aldridge *et al.*, 2005a), alors que le traitement au CPF lors de la fin de la gestation (GD 15-18) ou pendant la deuxième semaine postnatale (PND 11-14) diminue le niveau d'anxiété chez la souris femelle (Ricceri *et al.*, 2006).

Cette opposition entre le rat et la souris, quant au fait que ce soient les animaux de sexe mâle ou de sexe femelle dont l'anxiété est altérée par le CPF, serait liée au niveau de base d'anxiété des animaux mâles et femelles qui est différent chez les deux espèces. En effet, les rats mâles sont plus anxieux que les rats femelles alors que les souris femelles sont plus anxieuses que les souris mâles (Augustsson *et al.*, 2005).

Avec notre type d'exposition au CPF - une exposition de longue durée allant de la fin de la gestation jusqu'à la fin de la seconde semaine postnatale, à une dose journalière de 5 mg/kg, appliquée aux mères par voie orale, et utilisant l'huile de maïs comme véhicule - nous avons également mis en évidence une augmentation du niveau d'anxiété chez la souris femelle. Ces résultats vont en sens inverse de ceux obtenus par Ricceri et collaborateurs avec leurs souris femelles (Ricceri *et al.*, 2006).

Afin de tenter d'expliquer les différences de résultats que nous avons obtenues dans les effets développementaux du CPF et ce qu'il a été décrit dans la littérature, nous pouvons décrire une série de différences dans le protocole expérimental.

- Exposition : voie, route et dose.

Le type d'exposition des jeunes aux OP que nous avons employé est indirect, car il est réalisé via la mère, que ce soit durant la fin de la gestation ou après la naissance alors que les autres études dont nous avons parlé décrivent un traitement direct des jeunes au CPF après la naissance.

Nous utilisons un type d'exposition par voie orale (chez la mère) alors que les autres équipes, utilisent toutes la voie sous-cutanée. Une exception est l'étude de Ricceri (Ricceri *et al.*, 2006), et ceci uniquement pour l'exposition prénatale.

Or, le traitement au CPF des jeunes *in utero* et via le lait maternel, et en particulier par voie orale chez les mères implique des conséquences au niveau du type d'exposition de leurs jeunes. L'une de ces conséquences est que la dose reçue par les jeunes est plus faible que par un traitement direct sous-cutané, en particulier après la naissance. En effet, dans notre protocole, le calcul de la dose de traitement de la mère s'établit en fonction du poids de la mère et non en fonction du poids croissant des jeunes. De plus, ce type d'exposition, par lequel le produit transite par la mère, permet une métabolisation et une élimination d'une partie du produit avant que celui-ci puisse parvenir via le lait aux jeunes. Chez le rat, il a été calculé que l'administration orale de 5 mg/kg (diluée dans l'huile de maïs) à la mère, au 5^{ème} jour après la naissance, ne représenterait l'équivalent que d'une exposition directe à 0,1 mg/kg chez le jeune, sur base de la concentration de CPF dans le lait, et de la consommation des jeunes (Mattsson *et al.*, 2000; Timchalk *et al.*, 2006). Nous pouvons donc dire que la dose d'insecticide reçue par les jeunes après la naissance au cours de notre protocole (5 mg/kg.jour via gavage de la mère) est beaucoup plus basse que celle reçue par les jeunes en sous-cutané, soit 1 et 5 mg/kg chez le rat (Dam *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2001; Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a) et entre 1 et 3 mg/kg chez la souris (Ricceri *et al.*, 2006).

Le fait d'utiliser une exposition via le lait procure une répartition de l'exposition de la descendance au produit différente que par traitement sous-cutané. En effet, par voie orale, l'exposition s'étale plus largement au cours de la journée et atteint une concentration sanguine moins élevée que par voie sous-cutanée (Marty *et al.*, 2007).

L'utilisation du DMSO est nécessaire pour la dilution du CPF en voie sous-cutanée. Seul, ce solvant est réputé très peu toxique (Santos *et al.*, 2003), par contre les effets produits lors de son association aux OP est sujet à controverse. Au départ, il a été suggéré que le DMSO pouvait augmenter les capacités toxiques de certains OP liées à leur pouvoir anticholinestérasique (Kocsis *et al.*, 1975), mais il semblerait que ces différences seraient liées à la voie d'exposition plutôt qu'à l'utilisation du DMSO, à condition de respecter une faible concentration en DMSO (Carr and Nail, 2008). Quoi qu'il en soit, l'inhibition de l'ACHé du cerveau à dose identique de CPF est plus haute par voie sous-cutanée que par voie orale (Carr and Nail, 2008).

Le fait d'utiliser la voie orale (gavage des mères) et de faibles doses d'insecticide OP fait participer de manière prépondérante la métabolisation par les entérocytes de la mère, avant que le métabolisme du foie intervienne. Dans ces cellules de l'intestin, le rapport entre la bioactivation du CPF (en CPF oxon) et sa détoxification n'est pas le même que dans le foie : il y a un rapport plus élevé de bioactivation dans le foie (Poet *et al.*, 2003).

En considérant que les mécanismes développementaux seraient non liés à l'inhibition de l'AChE du cerveau pour sa fonction catalytique, la présence plus grande du protoxique ou de son métabolite ne semble pas très importante. Par contre, si on tient en compte que ces deux molécules interviennent dans des mécanismes différents lors du développement du cerveau (Whitney *et al.*, 1995; Mileson *et al.*, 1998; Schuh *et al.*, 2002), la répartition de la concentration du protoxique (CPF) et de son métabolite (CPO) revêt une importance capitale dans le type d'effet produit. La route s'avère donc très importante dans les mécanismes impliqués dans la toxicité développementale et pourrait représenter une explication quant aux différences de résultats obtenus dans notre expérience d'exposition par voie orale et dans les autres expériences d'exposition par voie sous-cutanée.

- La longueur de la période d'exposition :

Nous utilisons une période d'exposition longue qui s'étend de la fin de la gestation à la fin de la deuxième semaine après la naissance, alors que toutes les autres expériences comportementales chez le rat (Dam *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2001; Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a) comme chez la souris (Ricceri *et al.*, 2006) ciblent une période courte de 4 jours.

Quelles que soient les différences entre les résultats de notre expérience d'exposition au CPF *in utero* et via le lait, et celles obtenues par les autres équipes qui utilisent la voie sous-cutanée, le mode d'exposition que nous avons choisi semble un bon compromis si l'on veut se rapprocher d'une exposition de type réel, environnemental dont nous essayons d'établir les possibles effets développementaux (Marty *et al.*, 2007). L'exposition par plusieurs gavages par jour serait encore plus réaliste, mais le risque d'augmentation du niveau d'anxiété des mères induit par le gavage serait un biais à l'expérience (Branchi *et al.*, 2005). En extrapolant les données de Mattsson et collaborateurs (Mattsson *et al.*, 2000), pour assurer aux jeunes une dose d'exposition entre 1 et 5 mg/kg par voie sous-cutanée, il faudrait une exposition par gavage de la mère 50 fois plus élevée, soit une dose comprise entre 50 et 250 mg/kg. Ces

doses relèvent plus d'un accident d'exposition aiguë et s'éloignent de notre objectif qui est une mesure des effets persistants de doses subtoxiques durant le développement. De plus, par notre technique d'exposition utilisant uniquement l'huile comme véhicule, nous évitons volontairement d'utiliser le DMSO, pour lequel le risque de produire des effets développementaux ou de modifier les capacités toxiques des OP est un sujet non résolu chez les mammifères (Carr and Nail, 2008).

Dans ce cadre de la toxicité développementale en doses subtoxiques faibles d'OP, nous avons donc pu démontrer que le CPF est capable de produire des altérations persistantes de l'activité chez la souris mâle, de la mémoire chez les souris de sexe mâle et de sexe femelle, de produire une augmentation du niveau de l'anxiété et de la dépression chez la souris femelle. Etant donné les similitudes des mécanismes de base du développement entre les rongeurs et les mammifères et au vu de la plus grande complexité de la mise en place du cerveau humain, nous suggérons que l'exposition au CPF en de faibles doses subtoxiques, voir environnementales durant le développement du cerveau serait susceptible de produire des effets développementaux chez l'Homme.

La PHO qui n'a pas encore donné lieu à des études de toxicité développementale s'avère pourtant produire des altérations comportementales très similaires à celles que nous avons décrites pour le CPF chez la souris au cours de notre expérience. En effet, la PHO induit comme le CPF une diminution du niveau de l'activité chez la souris mâle et une augmentation du niveau d'anxiété et de dépression chez la souris femelle, qui est d'ailleurs plus importante que pour le CPF. La PHO ne semble pas altérer de la même manière la mémoire des souris. En effet la PHO altère non pas la mémoire spatiale à court terme des mâles comme le CPF mais produit une altération de la mémoire spatiale de travail des femelles.

Par le même raisonnement que nous venons de faire le CPF, si la PHO peut exposer les hommes en développement, cet insecticide est donc tout aussi susceptible de produire des effets développementaux chez l'Homme et ne serait pas un bon remplaçant des autres OP, comme le CPF, dont certaines formes de toxicité développementale a été démontrée.

Slotkin a montré que les OP en doses subtoxiques pouvaient toucher de manière différente les mécanismes du développement, et au moins modifier l'activité du système sérotoninergique (Slotkin and Seidler, 2008c). D'autres différences, comme l'importance de la forme bioactive et originale des OP ont sans doute un rôle également à jouer dans le type d'effet produit. De nombreuses études seront encore nécessaires pour élucider les mécanismes de toxicité de la PHO. Aussi, nous devons ajouter que la phosalone utilisée ici est sous sa forme commerciale

(Zolone), et que le CPF est sous sa forme pure. Le rôle des adjuvants dans la solution d'exposition pourrait jouer un rôle dans les effets comportementaux développés par les souris.

En conclusion, par les effets détectés à l'aide de notre modèle souris, nous pouvons suggérer que tant le CPF que la PHO sont susceptibles de produire des effets développementaux néfastes chez l'Homme, tels qu'une altération de la mémoire, une altération de l'activité, des troubles de l'anxiété et des signes de dépression, et ceci à partir de concentrations subtoxiques plus basses que celles répertoriées pour des périodes d'exposition plus courtes chez les rongeurs. Une grande attention devrait être retenue lors des études épidémiologiques (chez l'Homme) à l'apparition de l'anxiété, de troubles de la mémoire et de l'activité chez l'adulte suite à l'exposition périnatale aux OP.

D'autre part, au vu des effets anxiogéniques obtenus par une exposition subtoxique de type long, *in utero* et via la lactation (GD 14-PND 14), par gavage de la mère, et utilisant l'huile de maïs comme véhicule, allant à l'opposé des effets anxiolytiques conséquents à des périodes d'exposition plus petites (4 jours), durant la fin de la gestation ou durant la fin de la seconde semaine postnatale, et utilisant des doses toujours subtoxiques mais plus élevées chez la souris femelle (Ricceri *et al.*, 2006), nous nous interrogeons à la fois sur l'impact du moment, de la durée et du niveau d'exposition aux doses subtoxiques de CPF sur le sens de l'altération développementale de l'anxiété. Nous allons dans les deux chapitres suivants tenter de répondre à ces questions.

CHAPITRE 3:

**“ANXIETY IN ADULT FEMALE MICE
FOLLOWING PERINATAL EXPOSURE TO
SUBTOXIC DOSES OF CHLORPYRIFOS”.**

3 “Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to subtoxic doses of chlorpyrifos”.

(Braquenier et al., 2009)

INTRODUCTION

Dans le chapitre 2, nous avons pu mettre en évidence qu’une exposition de longue durée à une dose journalière subtoxique de CPF durant le développement du cerveau produit une série d’altérations comportementales persistantes chez les souris. L’une de ces altérations est une augmentation du niveau de l’anxiété chez les souris femelles. Cependant, les résultats d’autres expériences réalisées dans la littérature suggèrent que la dose journalière utilisée pourrait être à l’origine de l’obtention de différentes modifications du niveau d’anxiété.

Aussi, nous voulons nous éloigner des doses d’exposition proches de la limite de toxicité du produit.

Pour ce faire, nous allons tenter par l’expérience suivante de mettre en évidence les effets produits par des doses égales et plus basses que celles qui ont donné une augmentation de l’anxiété chez les souris femelles dans notre première expérience.

Ce chapitre est présenté sous forme d’une publication proposée dans *Neurotoxicology and Teratology*

Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to Chlorpyrifos.

Jean-Baptiste Braquenier^{*}, Etienne Quertemont[†], Ezio Tirelli[†], Jean-Christophe Plumier^{*}.

Abstract.

Epidemiologic studies suggested a possible link between prenatal exposure to organophosphate insecticides (OP) and long-term mental delay and some behavioral troubles. Experimental studies in rats and mice have confirmed that a relatively short exposure to low doses of OP such as Chlorpyrifos (CPF) during specific perinatal periods decreased anxiety-like behaviors. In the present study, we report that chronic perinatal exposure (GD15-PND14) to low doses of CPF lead to an increase (and not a decrease) in anxiety-like behaviors of female mouse offspring.

Gestating or lactating female mice were exposed to CPF (0.2; 1; or 5 mg/kg.day) by oral treatment during 18 consecutive days. Following a recovery period of several weeks, the anxiety of adult female offspring was determined using neurobehavioral tests (elevated plus-maze and light/dark box tests).

Our results showed that CPF-exposed female offspring were more anxious than controls. In addition, the importance of anxiety-like behavior depended on the level of exposure to CPF during gestation and lactation. The dose/response distribution of anxiety-like behavior presented a bell-shape curve with a maximal effect observed at the 1 mg/kg.day dose.

^{*} Physiologie animale, Département des Sciences et Gestion de l'Environnement, Boulevard du Rectorat, 27. 4000 Liège 1 –Belgique. jbBraquenier@ulg.ac.be; JC.Plumier@ulg.ac.be

[†] Neurosciences comportementale et psychopharmacologie expérimentale. Centre de Neurosciences Cognitives et Comportementales (CNCC), BAT. B32. Boulevard du Rectorat, 5. 4000 Liège 1-Belgique. equertemont@ulg.ac.be; Ezio.Tirelli@ulg.ac.be

Our results confirm that OP exposure during the perinatal period can induce long-term alterations in mouse anxiety-like behaviors and suggest that the means and the duration of OP exposure during brain development may be factors to consider when studying the development of anxiety.

1. Introduction

Organophosphorus insecticides (OP) consist in a family of cholinesterase inhibitors suspected to interfere with the normal development of the central nervous system. The effects of OP on brain development have been proposed to be a direct consequence of the inhibition of brain acetylcholinesterase (AChE) during critical phases of the early brain development. However, non-cholinergic actions of OP have also been described as possible mechanisms causing developmental neurotoxicity. Many defects have been reported in animals exposed to OP: reduced synaptogenesis, abnormal cell differentiation, problems in gene transcription and DNA synthesis [28], modifications of the expression of transcription factors [8], altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein [29], alterations in signaling of adenylyl cyclase [20] and of various neurotransmitters like monoamines, norepinephrine, dopamine, and serotonin [2,3,33,34,36]. Some of these mechanisms occurred at OP doses below the threshold for any systemic symptoms associated with inhibition of cholinesterases, referred to as “nontoxic” or “subtoxic” doses. Considering the extent of cellular dysfunctions associated to OP exposure, it is not surprising to observe several behavioral disturbances in animals.

Perinatal exposures to subtoxic doses of OP caused memory deficits, abnormal social behaviors, increase in locomotor activity as well as changes in anxiety levels [3,9,14,17,26,42]. Behavioral studies in rats and mice have reported that a subtoxic exposure to CPF during specific perinatal periods produced a decrease in anxiety [1,26,43]. In these

studies, the windows of OP exposure were relatively narrow to target specific developmental phases of the brain development. Using such strategy, any behavioral effect could be correlated more easily to the development of a specific neural system occurring during the exposure period and a possible relationship could be investigated. So, if the use of a short exposure period gives interesting data to explore mechanisms mediating a specific developmental neurotoxicity it would be less appropriate or adapted to predict overall behavioral effects susceptible to occur after environmental exposures of CPF (chronic perinatal exposure to low doses [21]).

Therefore, the aim of the present study was to assess the behavioral effects of a sustained exposure to subtoxic doses. We compared the effects of three different doses of CPF, during brain ontogenesis in mice and tested whether such OP exposure altered the levels of anxiety in mice. Using this animal model, we intend to evaluate whether low doses of OP may represent a developmental risk to disrupt the normal level of anxiety in humans.

2. Methods.

All experimental procedures were carried out according to the European Communities Council Directive (86/609/EEC) for care and use of laboratory animals. The experimental protocols were reviewed and approved by the Animal Care Committee of the University of Liège, Belgium.

2.1. Chemicals.

CPF solutions (0.2, 1 and 5 mg/kg.day) were made of pure CPF (PESTANAL®), Empirical Formula (Hill Notation): $C_9H_{11}C_3NO_3PS$, Formula Weight: 350.59 (Sigma-Aldrich, Bernen - Belgium) diluted in corn oil (Sigma-Aldrich). The volume used for oral administration (gavage) was standardized to 100 μ l/ 40g of mouse weight.

2.2. *Animals and treatments.*

For each test (elevated plus-maze and light/dark box test) each gestational adult female CD1 mouse (Charles River laboratories, France) was housed in plastic cages under a 12-hour light/dark cycle (light on at 8:00 AM) at a constant temperature (21°C) and was given *ad libitum* access to food and water. Four groups of gestational mice were constituted: three groups of mice received CPF: 0.2; 1 and 5 mg/kg.day (0.2 mg CPF; 1mg CPF; 5mg CPF); and one control group (VEH) received corn oil alone. To cover several susceptible perinatal periods, such as the last week of gestation, the first postnatal days and even the adolescence [25,26], we exposed mice over an extended period: gestating females were treated by oral gavage (100µl/ 40g weight per day) on the last four gestational days and gavage lasted during the first two weeks of lactation (GD15-PND14). Therefore, the mouse pups of the experimental groups were exposed to CPF via their mother.

Offspring of each dam were restricted to four males and four females on postnatal day 1 (PND1) to produce standard breeding conditions. After weaning, on postnatal day 21 (PND21), male and female mice were separated. In preliminary experiments, developmental alteration of the anxiety level in mice with nontoxic doses of CPF were only observed in females, confirming results from Ricceri et al. [26]. Thus, in the present study only female offspring were examined using behavioral tests. One randomly chosen female of each litter was assigned to each behavioral test (elevated plus-maze, light/dark box and actometric tests).

2.3. *AChE activity assays:*

In rats, CPF (1-5mg/kg.day, sc) produced developmental neurotoxic effects in the developing brain at about 20% cholinesterase inhibition [31,32,38,44], although overt symptoms of cholinergic overstimulation generally require above 70% of cholinesterase inhibition [7,25,26,43]. In the present study, the maximum dose of CPF (5mg/kg.day) was chosen to

decrease the normal activity of brain AChE by less than 20%. In order to check that cholinesterase inhibition did not exceed 20 % of brain AChE activity, AChE assays were carried out after CPF administration. Some of the pups (on PND1) were euthanized 3 hours after oral gavage. After decapitation, the whole brain was immediately frozen on dry ice and stored at -80°C for further analysis. Determination of brain AChE were carried out using the Roche Diagnostics cholinesterase method according to Ellman et al. [11]. The test principle is based on the use of acetylthiocholine as substrate for the determination of AChE activity. Acetylthiocholine is split into acetate and thiocholine, which react with dithiobisnitrobenzoic acid (Ellman's reagent) to form the yellow-coloured 5-mercapto-2nitrobenzoic acid. The rate of colour formation is directly proportional to the cholinesterase activity.

2.4. Light/dark box test

The light/dark box test consists in a box with two compartments: a small, opaque, black compartment (16x16x16cm) closed by a red glass and a large, translucent and illuminated white compartment (25x25x30cm). The compartments are connected by an opening (5x5cm) to allow mice to freely move from one compartment to the other. A spot light illuminated the apparatus to provide an aversive stimulus (only visible from the white compartment). A camera (Logitech QuickCam Pro5000) positioned 1 meter above the apparatus and connected to a computer to record mouse behaviors during the test. The evaluation of anxiety was determined from later viewing of video recording. On PND72, animals of each experimental group (VEH, 0.2; 1; 5 mg/kg.day CPF) were individually placed in the center of the white compartment with their head opposite to the opening and were allowed to explore the compartments for five minutes. The time spent in each compartment and the number of crosses between compartments was recorded.

This apparatus provides an unfamiliar environment for mice where a natural conflict occurs between the tendency to explore a novel environment (spontaneous exploratory behavior) and the innate aversion to open field and brightly illuminated area. As the white, but not the dark, compartment provides stress-like conditions for mice, the percentage of time spent by the mice in the dark compartment is used as a measure of anxiety in mice. Also, the number of crosses between compartments provides an estimation of the anxiety level if measured without changes of spontaneous locomotion activity. [4]. The spontaneous locomotion activity level is measured using the Actometric test described below.

2.5. Elevated plus-maze.

The elevated plus-maze consisted of two enclosed arms (29 x 5 x15 cm) and two open arms (29 x 5 x 2.5cm) placed at a right angle crossing in a common central platform (5x5 cm). The apparatus was elevated to a height of 80 cm above the floor. The whole apparatus was made of black hard plastic and the open arms were made of gray hard plastic [39]. The observer was visually isolated from the apparatus with a panel to avoid interference on the mouse behavior during the test. Testing sessions were recorded using a webcam (Logitech Quickcam pro5000) positioned one meter above the center of the maze. Each mouse was placed on one of the closed arms and allowed to explore the maze for 5 minutes.

The time spent on each arm and the numbers of entries in open and closed arms were scored from video sequences by a trained observer blind to the mouse treatment. The anxiety level of mice was assessed by the time spent on the open arms divided by total time and by the number of open arms entry divided by total entry number [5,30]. The total number of entries in both open and closed arms was used as a measure of general activity. This test was carried out on Post Natal Day 80 (PND80).

2.6. *Actometric test.*

The experimental apparatus consisted of transparent Plexiglas chambers (42×42 cm) partitioned into six compartments (7×42 cm), allowing the simultaneous testing of six mice. The transparent square floor of the apparatus allowed to record the locomotion of mice with a S-VHS video camera (Panasonic NS-MS1) positioned directly underneath the apparatus. Videotapes were later scored by one or two trained observers. The apparatus was individually located in a small, ventilated, and heated (21–23°C) white room (140×140-cm surface×245-cm height). The floor of each compartment was divided into six squares (7×7 cm) by black lines and the spontaneous locomotor activity was measured as the number of successive line crossing during 5 minutes [10]. This measure of spontaneous locomotor activity was realized once per day during 8 days.

2.7. *Statistical data analysis*

For each behavioral measure, data were analyzed with a mixed-model or one-way analysis of variance (ANOVA) comparing the effects between the four abovementioned groups. When possible, the statistical Dunnett test was used to compare the means of each CPF-treated group with the mean of the vehicle group. The statistical significance was conventionally set at $p < 0.05$. All the results are presented as means \pm S.E.M. (standard error of mean).

3. Results

3.1. *AChE activity assays*

The brain AChE activity of offspring was only assessed in the group treated with the greatest dose of CPF (5 mg/kg.day). We measured a decrease of cholinesterase activity in CPF-exposed PND1 pups (14.0 ± 2.9 % compared to the VEH group).

3.2. *Weight of female offspring.*

The mean weight of PND70 female offspring was 28.79 ± 0.27 g for the VEH group; 28.89 ± 0.21 g for the 0.2mg CPF group; 29.72 ± 0.31 g for the 1mg CPF group and 29.75 ± 0.21 g for the 5mg CPF group. ANOVA confirmed no significant difference between the weights of control and CPF-treated mice ($F(3, 33) = 0.4542$, $p = 0.72$).

3.3. *Spontaneous locomotor activity level in female offspring.*

As shown in Figure 1 the mean locomotor activity (8 trials of 5 min once a day) reached 952.5 ± 130.5 cm for female offspring of the VEH group. Similar activities were determined for CPF-exposed mice: 950.46 ± 54.9 cm for 0.2 mg CPF-exposed mice; 852.7 ± 104.1 cm for 1mg CPF-exposed mice and; 873.4 ± 104.3 cm for 5mg CPF-exposed mice.

ANOVA used repeated measures (effect “day x treatment group”) determined that there was no statistical difference in the evolution of the locomotor activity along the 8 days trial between the 3 treatment groups, demonstrating similar habituation between groups.

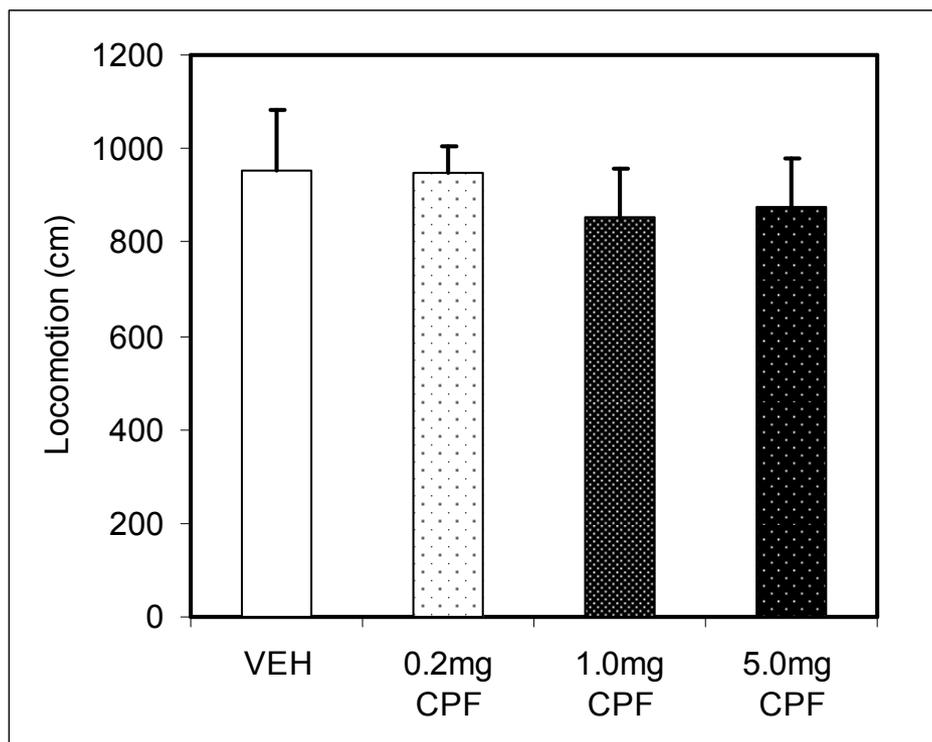


Figure 1: Actometric test.

The level of spontaneous locomotor activity of female offspring (mean \pm S.E.M.) is measured during 5 min once a day during 8 days. VEH group (n=10); 0.2 mg CPF group (n=9); 1mg CPF group (n=8); 5mg CPF group (n=10)

Concerning the mean locomotor activity, the one-way ANOVA revealed no difference between VEH and CPF-treated groups ($F(3, 40)=0.23743$, $p=0.87$) and the Dunnett analysis confirmed that there was no difference between each CPF-exposed group and the VEH group ($p > 0.5$ for each paired test). In conclusion perinatal exposure to CPF did not significantly affect the locomotor activity of adult female CD1 offspring.

3.4. *Anxiety-like behaviors in female offspring assessed using the light/dark box test:*

As a first measure of anxiety level we determined the percent of time spent in the dark compartment during 5 minutes. Female offspring of the VEH group spent $55.33 \pm 0.83\%$ of

time in the dark compartment (Fig. 2.A) compared to $59.63 \pm 1.21\%$ for mice of the 0.2 mg CPF group; $63.58 \pm 2.24\%$ for mice of the 1mg CPF group; and $53.40 \pm 1.19\%$ for mice of the 5mg CPF group. ANOVA did not show a significant difference between groups ($F(3, 33)=1.1907$, $p=0.33$). The statistical Dunnett test did not reveal any significant increase in the percentage of time spent in the dark box by CPF-exposed mice.

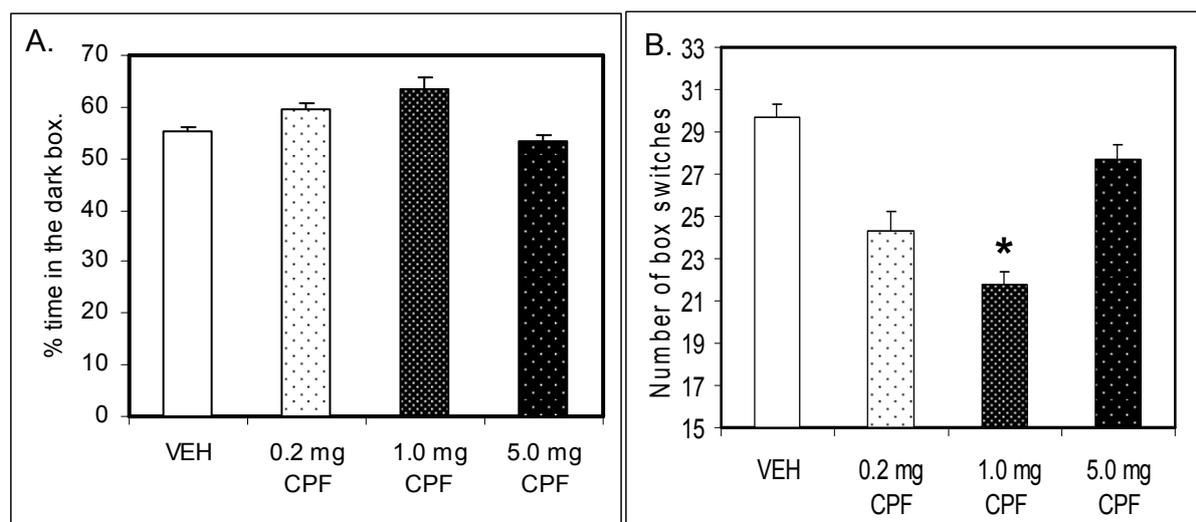


Figure 2: Anxiety level using the dark/light box test.

A. Percent of time spent in the dark box (mean \pm S.E.M.); B. Number of box switches during 5 minutes by offspring exposed to peanut oil only (Vehicle: VEH; $n=10$), and offspring exposed to different doses of chlorpyrifos (0.2 mg CPF group ($n=9$); 1 mg CPF group ($n=8$); 5 mg CPF ($n=10$)). (*): significantly different compared to VEH.

We also assessed the anxiety level by counting the number of box switches. This number tightly reflected mouse anxiety since control and experimental mice showed similar locomotor activities (Figure 1). The mean number of box switches during the light/dark box test (Fig. 2.B) was higher in the VEH group (29.70 ± 0.59) than in CPF-exposed groups: 0.2 mg CPF group (24.33 ± 0.92), 1 mg CPF group (21.75 ± 0.63) and 5 mg CPF group (27.70 ± 0.69). The ANOVA detected a nearly significant difference between the groups [$F(3,$

33)=2.4943, $p=0.08$] and the Dunnett test revealed a significant reduction in the number of box switches only in the 1mg CPF group ($p=0.02$).

As described for the actometric test, since CPF did not alter the level of mouse activity, any difference in the number of box switches could be directly related to effects of the drug on the behavior and not on the locomotor activity of the tested animal.

We concluded that CPF induced an increase in anxiety level of female mice with a maximum effect at the medium dose (1mg/kg.day).

3.5. *Anxiety-like behaviors of female offspring using the elevated plus-maze*

Two different measures were used to evaluate the anxiety level in each group: the time spent on open arms and the number of entries in open arms. A decrease of either measure compared to controls suggests an increase of the anxiety level in mice.

As shown in figure 3.A, the mean percentage of time spent on open arms was lower in CPF-treated groups (0.2 mg CPF, 21.00 ± 0.98 %; 1 mg CPF, 13.21 ± 1.27 %; and 5 mg CPF, 18.97 ± 0.86 %) groups than in the VEH group (23.80 ± 0.76 %). ANOVA revealed a marginal difference between groups ($F(3, 33)=2.2900$, $p=0.10$). The Dunnett analysis detected a significant decrease in the percent time spent on the open arms for the 1 mg CPF group compared to the VEH group ($p=0.02$), suggesting an anxiogenic effect of a perinatal exposure to 1 mg/kg.day of CPF.

The second measure of the anxiety level was the proportion of entries in the open arms (figure 3.B). The mean of percent number open arm entries was lower in the CPF-exposed groups: 0.2 mg CPF (33.71 ± 0.93 %), 1 mg CPF (20.58 ± 1.77 %) and 5mg CPF (30.10 ± 1.07 %) compared to the non-exposed VEH group (38.09 ± 1.18 %). ANOVA detected a significant difference between groups: $F(3, 33)=3,7409$, $p=0.02$. The Dunnett statistical test determined

that the 1mg CPF group was significantly lower than the control group ($p= 0.004$) but not the other exposed groups CPF 0.2 mg ($p= 0.40$) and CPF 5 mg ($p=0.15$).

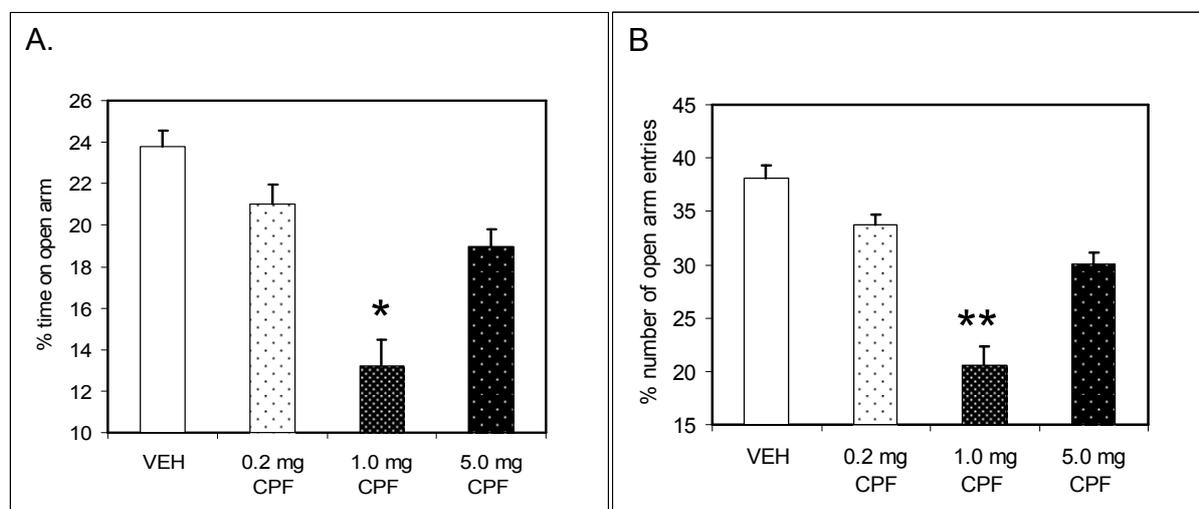


Figure 3: Anxiety-like behaviours evaluated using the elevated plus-maze.

A. Percentage of time spent on the open arms by CPF-exposed female offspring (0.2 mg CPF (n=9); 1 mg CPF (n=8); 5 mg CPF (n=10)) and by vehicle-exposed mice (VEH (n=10)).

B. Percent number of open arm entries for the three groups of CPF-exposed offspring and the VEH group. Values are expressed as mean \pm S.E.M.

(*) significantly different than VEH at $p < 0.05$, (**) at $p < 0.01$.

3.6. Measure of the general activity of female offspring in the elevated plus-maze.

The total number of arm entries is considered as a measure of locomotor activity in the elevated plus-maze (figure 4). The mean of total entries was similar between groups (VEH group (22.50 ± 0.57), CPF 0.2 mg (21.78 ± 0.79), CPF 1 mg (19.00 ± 0.74) and CPF 5mg (19.70 ± 0.61) ($F(3, 33)=,64290$, $p=0.59$). There was no difference in the locomotor activity of mice between any CPF-exposed group and the VEH group (Dunnett, $p > 0.05$). These results confirmed that perinatal exposure to CPF did not alter the activity of adult female offspring.

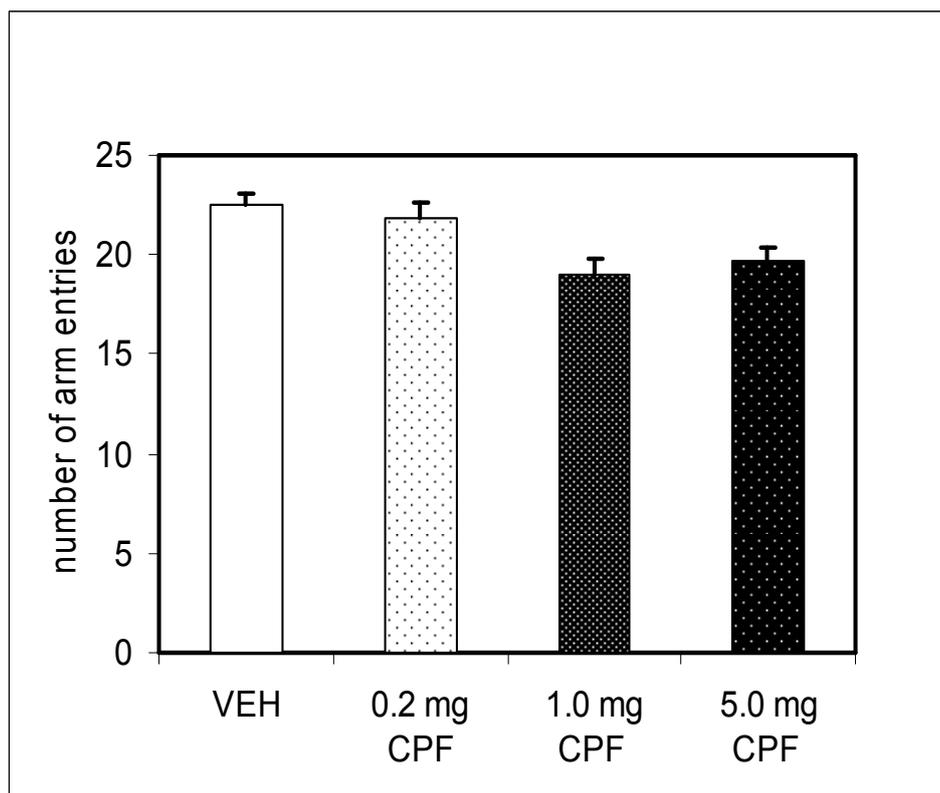


Figure 4: Level of activity measured using the elevated plus maze.

Number of crossing in the center platform (or the total arm entries) during five minutes by the non-exposed group (VEH, n=10) and the CPF-exposed groups (0.2 mg CPF (n=9); 1 mg CPF (n=8); 5 mg CP (n=10)). Values are expressed as mean \pm S.E.M.

4. Discussion

The results of the present study demonstrated that a perinatal exposure to subtoxic doses of CPF increased the level of anxiety of adult female offspring. Exposure to 1mg/kg.day CPF induced more anxiety-like behaviors than exposure to 5mg/kg.day CPF. In fact, CPF doses effectively received by pups were even lower than 1mg/kg.day. The effective dose received by a pup was reduced by three different means: a dilution effect (the oral doses of 0.2; 1 and 5 mg/kg.day were based on the weight of the mother, without taking into account the weight of pups), detoxification by the intestine, which was not negligible especially following the low

dose received by oral exposure [22], and detoxification by the liver of the mothers. For example, in rats, the dose received by rat pups on PND5 after oral gavage of the lactating mothers using 5 mg/kg.day was measured at only 0.1 mg/kg.day [19]. In addition, the effective dose in pups decreased as pups got older due to a growing detoxification capacity [24-26,40-43,47].

Based on these observations, it is quite probable that the anti-cholinesterase activity of CPF did not directly cause the increase of anxiety levels observed in CPF-treated offspring. Even an exposure to 5mg/kg.day by oral administration may be considered below the threshold of systemic toxicity generally observed above 20% reduction of AChE activity [6]. This result suggests that the development of anxiety could be attributed to an other action than the inhibition of brain AChE, such as effects on the serotonergic system [1,2,34,35,37]

Our results confirm that subtoxic exposure to CPF during brain development modifies anxiety-like behaviours in CD1 adult offspring [26]. However, we observed an increase in anxiety levels of female offspring rather than a decrease as previously reported by Ricceri et al. (2006). The discrepancy between the present results and those of Ricceri and collaborators could hardly be explained by differences in mice. In both experiments, CD1 adult (80 day old or 120 day old) offspring were used. The discrepancy could rather be explained by differences between exposure protocols. Firstly, the duration and the periods of OP exposure were different. In the present study, mice were exposed to OP from the end of the gestation to the end of the second week after birth (GD15 to PND14). By contrast, Ricceri et al. exposed CD1 mice during either a single period or two short periods: the last 4 days of the gestation and/or four days during the second postnatal week (PND11-14). Secondly, the routes of OP treatment also differed. CPF was administered through maternal contamination by oral gavage in the present study and via subcutaneous injections in Ricceri et al (2006). Orally administered CPF is firstly metabolized by the intestine while subcutaneously injected CPF is

only metabolized by the liver. Especially with small exposition dose of CPF, the intestinal metabolism may further decrease the biodisponibility of CPF [22]. In addition, although both liver and intestine microsomes are able to metabolize CPF, the balance between the activation to deactivation of CPF differs. For example, the intestine microsomes have a lower capacity to metabolize the active form of CPF (CPF oxon) into TCP because the responsible enzyme, PON1, shows a lower activity in the intestine than in the liver [22]. So the concentration of each metabolite could differ between oral and subcutaneous treatments, with potentially different consequences on toxicity and behaviors. [13,29,45].

Altogether the present results and those of previous studies confirm that exposure to OP during development affects anxiety. However, these effects may differ according to the period, the duration, the dose and the route of OP exposure. To elucidate the neurodevelopmental mechanisms triggered by OP exposure, doses and periods of OP exposure must be carefully monitored as must be the routes of administration [18]. Based on the work of Mattsson [19] the real dose received by each pup via lactation (in PND5) is 50 times lower than that given to the mother. Therefore, an exposure of pups to 3 to 6 mg/kg.day CPF can rarely occur in the environment. To achieve such dose in pups, the mother should be exposed to a dose largely exceeding LD50. So to study effects of subtoxic perinatal exposure to CPF, administration of 5mg/kg.day to the dam seems a more relevant exposure scenario. Thus, oral administration to dam may represent a useful way to take into account pharmacodynamics of OP and their metabolites on the development of pups for future experimental research.

Early epidemiologic studies [15,16] suggested a relationship between exposure to OP insecticides and an increase in the prevalence of many behavioral troubles including mood

disorders such as anxiety. In more recent studies, OP insecticides have been pointed out as possible causes of alterations of the development of the human brain, leading to mental delay and behavioral abnormalities in infants [12,23,27,46]. In these studies, measures of prenatal exposure to CPF were collected and correlated to brain development and behaviors. However, these studies were realized on infants, not on adults. Perhaps behavioral studies on these same subjects, once adults, will give interesting data in twenty years. In the present study, we showed that subtoxic doses of OP (even at very low doses) administered during a wide perinatal period induce an increase in anxiety of adult female offspring. These results confirm that CPF can affect brain development, at least in mice, and suggest that OP represents a potential developmental risk in humans.

Acknowledgements.

This work was supported by the University of Liège. We thank Sandrine Seyen for her excellent technical help for AChE activity assay, Vincent Didone (CNCC) for his useful discussions. We are also grateful to Philippe Marc (GAWI, Fruitnet) for his useful suggestions.

References

- [1] J.E. Aldridge, E.D. Levin, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression, *Environ Health Perspect* 113 (2005) 527-31.
- [2] J.E. Aldridge, A. Meyer, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure, *Environ Health Perspect* 113 (2005) 1027-31.
- [3] J.E. Aldridge, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling, *Environ Health Perspect* 112 (2004) 148-55.
- [4] M. Bourin, M. Hascoet, The mouse light/dark box test, *Eur J Pharmacol* 463 (2003) 55-65.

- [5] A.P. Carobrez, L.J. Bertoglio, Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on, *Neurosci Biobehav Rev* 29 (2005) 1193-205.
- [6] D.J. Clegg, M. van Gemert, Determination of the reference dose for chlorpyrifos: proceedings of an expert panel, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2 (1999) 211-55.
- [7] D.J. Clegg, M. van Gemert, Expert panel report of human studies on chlorpyrifos and/or other organophosphate exposures, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2 (1999) 257-79.
- [8] T.L. Crumpton, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation, *Brain Res* 857 (2000) 87-98.
- [9] K. Dam, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity, *Brain Res Dev Brain Res* 121 (2000) 179-87.
- [10] V. Didone, C. Quoilin, E. Tirelli, E. Quertemont, Parametric analysis of the development and expression of ethanol-induced behavioral sensitization in female Swiss mice: effects of dose, injection schedule, and test context, *Psychopharmacology (Berl)* (2008).
- [11] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, Jr., R.M. Feather-Stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol* 7 (1961) 88-95.
- [12] B. Eskenazi, L.G. Rosas, A.R. Marks, A. Bradman, K. Harley, N. Holland, C. Johnson, L. Fenster, D.B. Barr, Pesticide toxicity and the developing brain, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102 (2008) 228-36.
- [13] M. Guizzetti, S. Pathak, G. Giordano, L.G. Costa, Effect of organophosphorus insecticides and their metabolites on astroglial cell proliferation, *Toxicology* 215 (2005) 182-90.
- [14] L.M. Icenogle, N.C. Christopher, W.P. Blackwelder, D.P. Caldwell, D. Qiao, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, E.D. Levin, Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation, *Neurotoxicol Teratol* 26 (2004) 95-101.
- [15] K. Jaga, C. Dharmani, The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide, *Rev Environ Health* 22 (2007) 57-73.
- [16] G.A. Jamal, S. Hansen, A. Pilkington, D. Buchanan, R.A. Gillham, M. Abdel-Azis, P.O. Julu, S.F. Al-Rawas, F. Hurley, J.P. Ballantyne, A clinical neurological, neurophysiological, and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticides, *Occup Environ Med* 59 (2002) 434-41.
- [17] E.D. Levin, N. Addy, A. Baruah, A. Elias, N.C. Christopher, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations, *Neurotoxicol Teratol* 24 (2002) 733-41.
- [18] M.S. Marty, J.Y. Domoradzki, S.C. Hansen, C. Timchalk, M.J. Bartels, J.L. Mattsson, The effect of route, vehicle, and divided doses on the pharmacokinetics of chlorpyrifos and its metabolite trichloropyridinol in neonatal Sprague-Dawley rats, *Toxicol Sci* 100 (2007) 360-73.
- [19] J.L. Mattsson, J.P. Maurissen, R.J. Nolan, K.A. Brzak, Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos, *Toxicol Sci* 53 (2000) 438-46.
- [20] A. Meyer, F.J. Seidler, J.E. Aldridge, C.A. Tate, M.M. Cousins, T.A. Slotkin, Critical periods for chlorpyrifos-induced developmental neurotoxicity: alterations in adenylyl

- cyclase signaling in adult rat brain regions after gestational or neonatal exposure, *Environ Health Perspect* 112 (2004) 295-301.
- [21] V.C. Moser, Animal models of chronic pesticide neurotoxicity, *Hum Exp Toxicol* 26 (2007) 321-31.
- [22] T.S. Poet, H. Wu, A.A. Kousba, C. Timchalk, In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon, *Toxicol Sci* 72 (2003) 193-200.
- [23] V.A. Rauh, R. Garfinkel, F.P. Perera, H.F. Andrews, L. Hoepner, D.B. Barr, R. Whitehead, D. Tang, R.W. Whyatt, Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children, *Pediatrics* 118 (2006) e1845-59.
- [24] L. Ricceri, D. Cutuli, A. Venerosi, M.L. Scattoni, G. Calamandrei, Neonatal basal forebrain cholinergic hypofunction affects ultrasonic vocalizations and fear conditioning responses in preweaning rats, *Behav Brain Res* 183 (2007) 111-7.
- [25] L. Ricceri, N. Markina, A. Valanzano, S. Fortuna, M.F. Cometa, A. Meneguz, G. Calamandrei, Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice, *Toxicol Appl Pharmacol* 191 (2003) 189-201.
- [26] L. Ricceri, A. Venerosi, F. Capone, M.F. Cometa, P. Lorenzini, S. Fortuna, G. Calamandrei, Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice, *Toxicol Sci* 93 (2006) 105-13.
- [27] L.G. Rosas, B. Eskenazi, Pesticides and child neurodevelopment, *Curr Opin Pediatr* 20 (2008) 191-7.
- [28] T.S. Roy, J.E. Andrews, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos, *Teratology* 58 (1998) 62-8.
- [29] R.A. Schuh, P.J. Lein, R.A. Beckles, D.A. Jett, Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons, *Toxicol Appl Pharmacol* 182 (2002) 176-85.
- [30] J.K. Shepherd, S.S. Grewal, A. Fletcher, D.J. Bill, C.T. Dourish, Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety, *Psychopharmacology (Berl)* 116 (1994) 56-64.
- [31] T.A. Slotkin, Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos, *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1 (1999) 71-80.
- [32] T.A. Slotkin, Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: a personal view from an academic perspective, *Neurotoxicology* 25 (2004) 631-40.
- [33] T.A. Slotkin, F.J. Seidler, The alterations in CNS serotonergic mechanisms caused by neonatal chlorpyrifos exposure are permanent, *Brain Res Dev Brain Res* 158 (2005) 115-9.
- [34] T.A. Slotkin, F.J. Seidler, Developmental exposure to terbutaline and chlorpyrifos, separately or sequentially, elicits presynaptic serotonergic hyperactivity in juvenile and adolescent rats, *Brain Res Bull* 73 (2007) 301-9.
- [35] T.A. Slotkin, F.J. Seidler, Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel, *Toxicol Appl Pharmacol* 233 (2008) 211-9.
- [36] T.A. Slotkin, F.J. Seidler, Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic serotonergic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: critical periods for regional and sex-selective effects, *Reprod Toxicol* 23 (2007) 421-7.

- [37] T.A. Slotkin, C.A. Tate, I.T. Ryde, E.D. Levin, F.J. Seidler, Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition, *Environ Health Perspect* 114 (2006) 1542-6.
- [38] X. Song, F.J. Seidler, J.L. Saleh, J. Zhang, S. Padilla, T.A. Slotkin, Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade, *Toxicol Appl Pharmacol* 145 (1997) 158-74.
- [39] S. Tambour, V. Didone, E. Tirelli, E. Quertemont, Dissociation between the locomotor and anxiolytic effects of acetaldehyde in the elevated plus-maze: evidence that acetaldehyde is not involved in the anxiolytic effects of ethanol in mice, *Eur Neuropsychopharmacol* 15 (2005) 655-62.
- [40] C. Timchalk, A.A. Kousba, T.S. Poet, An age-dependent physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in the preweanling rat, *Toxicol Sci* 98 (2007) 348-65.
- [41] C. Timchalk, T.S. Poet, A.A. Kousba, Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos, *Toxicology* 220 (2006) 13-25.
- [42] A. Venerosi, G. Calamandrei, L. Ricceri, A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure, *Neurotoxicol Teratol* 28 (2006) 466-71.
- [43] A. Venerosi, D. Cutuli, V. Colonnello, D. Cardona, L. Ricceri, G. Calamandrei, Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood, *Neurotoxicol Teratol* 30 (2008) 468-74.
- [44] K.D. Whitney, F.J. Seidler, T.A. Slotkin, Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms, *Toxicol Appl Pharmacol* 134 (1995) 53-62.
- [45] D. Yang, A. Howard, D. Bruun, M. Ajua-Alemanj, C. Pickart, P.J. Lein, Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon inhibit axonal growth by interfering with the morphogenic activity of acetylcholinesterase, *Toxicol Appl Pharmacol* 228 (2008) 32-41.
- [46] J.G. Young, B. Eskenazi, E.A. Gladstone, A. Bradman, L. Pedersen, C. Johnson, D.B. Barr, C.E. Furlong, N.T. Holland, Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates, *Neurotoxicology* 26 (2005) 199-209.
- [47] Q. Zheng, K. Olivier, Y.K. Won, C.N. Pope, Comparative cholinergic neurotoxicity of oral chlorpyrifos exposures in preweanling and adult rats, *Toxicol Sci* 55 (2000) 124-32.
-

CONCLUSION

En résumé, l'exposition de longue durée (GD 15-PND 14) à une dose chronique subtoxique de 1 mg/kg de CPF durant le développement (*in utero* et via le lait) produit une augmentation persistante du niveau d'anxiété chez la souris CD1 femelle d'une manière plus intense que celle produite par une dose supérieure 5 mg/kg.

La dose jouerait donc bien un rôle dans la manière dont est altérée l'anxiété. Nous nous interrogeons sur les effets que pourraient produire des doses plus proches de celles utilisées par Ricceri et collaborateurs (exposition directe des jeunes à 3 mg/kg de CPF par voie sous-cutanée) (Ricceri *et al.*, 2006) et qui seraient à l'origine d'une diminution du niveau d'anxiété.

CHAPITRE 4 :
« RECHERCHE DE LA PÉRIODE
SENSIBLE POUR L'ANXIÉTÉ
DÉVELOPPEMENTALE PERSISTANTE
LIÉE À L'EXPOSITION POSTNATALE AU
CHLORPYRIFOS EN DOSES
SUBTOXIQUES »

4 « RECHERCHE DE LA PÉRIODE SENSIBLE POUR L'ANXIÉTÉ DÉVELOPPEMENTALE PERSISTANTE LIÉE À L'EXPOSITION POSTNATALE AU CHLORPYRIFOS EN DOSES SUBTOXIQUES ».

4.1 INTRODUCTION.

Rappelons qu'une exposition subtoxique au CPF peut provoquer une altération persistante du niveau d'anxiété chez les rongeurs. En effet, quatre jours d'exposition périnatale au CPF à des doses subtoxiques peuvent suffire à engendrer une diminution du niveau de l'anxiété chez les rats (Aldridge *et al.*, 2005a), comme chez les souris adultes (Ricceri *et al.*, 2006). Chez la souris, la fin de gestation (GD 15-18) et plus particulièrement une période postnatale tardive (PND 11-14) s'avèrent être les périodes les plus sensibles à l'altération développementale de l'anxiété. Nous savons également qu'une exposition subtoxique chronique au CPF durant une bonne partie du développement (GD 15-PND 14) peut produire des altérations du niveau de l'anxiété chez les femelles adultes (chapitres 2 et 3). Cependant, à l'inverse des résultats obtenus par Ricceri et collaborateurs (Ricceri *et al.*, 2006), cette exposition de type long au CPF produit une élévation du niveau d'anxiété.

Nous suspectons que des différences entre notre protocole expérimental d'exposition et celui de Ricceri et collaborateurs (longueur du traitement, route et véhicule) pourraient expliquer les effets opposés du CPF sur l'anxiété. En particulier, notre exposition au CPF se déroule durant une très longue période du développement (GD 15 à PND 14) alors que Ricceri et collaborateurs traitent les souris pendant 4 jours seulement, et ceci durant les derniers jours de gestation (GD 15-18) ou en fin de lactation (PND 11-14).

Aucune étude d'exposition à des doses subtoxiques de CPF durant 4 jours du développement chez les rongeurs n'a pu mettre en évidence une augmentation du niveau d'anxiété. Cependant, l'utilisation de deux périodes d'exposition successives (fin de gestation et postnatale tardive) peut à certaines concentrations annuler les effets produits par chacune d'entre elles séparément. Ricceri et collaborateurs suggèrent donc une explication : l'altération de l'anxiété par le CPF comprendrait plusieurs périodes durant lesquelles différents mécanismes seraient impliqués (Ricceri *et al.*, 2006). Selon cette idée de plusieurs mécanismes d'altération successifs, il n'est donc pas impossible, au vu de la complexité de la

mise en place de l'anxiété, qu'une exposition subtoxique de longue durée au CPF puisse créer un résultat opposé à celui d'une exposition courte durée choisie à un moment bien particulier du développement.

Nous devons relever également une différence quant à la dose chronique réellement reçue par les jeunes. En effet, nous avons exposé les jeunes souris en développement via la mère par gavage (chapitres 2 et 3), alors que Ricceri et collaborateurs traitent directement les jeunes souris par voie sous-cutanée (après la naissance) (Ricceri *et al.*, 2006). Or, pour une dose de traitement identique, la dose réellement reçue par les jeunes est beaucoup plus basse lors du gavage de la mère que par voie directe sous-cutanée des jeunes. Il y a plusieurs raisons à cela. La première raison est technique car après la naissance, la dose de gavage des mères au CPF est calculée en fonction du poids de celle-ci qui reste plus ou moins constant, alors que le poids des jeunes continue à croître avec le temps. La deuxième raison est que l'exposition via la mère permet la métabolisation et l'élimination d'une partie du produit avant que les jeunes soient exposés, ce qui diminue la dose de CPF reçue par les jeunes.

L'exposition au CPF en très faibles doses par le lait maternel pourrait également influencer qualitativement l'exposition. En effet cette technique fait intervenir le métabolisme de l'intestin du jeune alors que ce n'est pas le cas par voie sous-cutanée. Il a été montré que le métabolisme par l'intestin diffère de celui du foie par une plus grande importance relative de la bioactivation (CPF en CPO) par rapport à sa désactivation (CPF en TCP et CPO en TCP) (voir chapitre 1.2.6). En conséquence, la proportion de la forme active (CPO) serait plus grande via le lait que par voie sous-cutanée avant que la métabolisation par le foie des jeunes puisse intervenir. Sachant que ces deux formes engagent des mécanismes d'altération du développement différents (Poet *et al.*, 2003), le moyen de traitement pourrait représenter une cause non négligeable dans le type d'effet développemental détecté.

Nous devons ajouter que l'exposition du jeune par le lait permet une répartition temporelle différente du produit que par voie sous-cutanée. En effet, par le lait, le CPF se retrouve plus progressivement dans le système sanguin et atteint une concentration maximum moins élevée que par une seule piqure sous-cutanée (Domoradzki *et al.*, 2004; Marty *et al.*, 2007). En fonction du taux maximum et du temps d'exposition journalier, il est possible que les altérations produites par le CPF soient différentes.

En résumé, nous suspectons que l'augmentation du niveau de l'anxiété chez la souris serait le résultat d'un niveau d'exposition plus faible et/ou d'une période d'exposition plus longue au

CPF que celles qui ont donné lieu à une diminution de l'anxiété. Notre expérience d'exposition chronique à plusieurs doses subtoxiques de CPF (par gavage de la mère, dans l'huile de maïs) a démontré qu'une dose plus faible, soit 1 mg/kg.jour, élève le niveau d'anxiété des souris femelles de manière plus intense que la dose plus élevée, soit 5 mg/kg.jour (mêmes conditions). Cela suggère que des doses plus élevées pourraient avoir un effet différent ou opposé sur le niveau de l'anxiété. Cependant, les différences entre notre protocole expérimental et celui de Ricceri et collaborateurs (Ricceri *et al.*, 2006), comme la longueur de la période d'exposition et le moyen d'exposition, ne nous permettent pas directement de comparer les doses appliquées. Aussi, afin d'approcher les doses anxiogènes utilisées par Ricceri et collaborateurs (6 mg/kg.jour) par voie sous-cutanée, il faudrait utiliser des doses d'exposition bien plus élevées que 5 mg/kg.jour par voie orale chez la mère, ce qui reviendrait à dépasser le seuil de toxicité aiguë chez la mère. Nous voulons cependant rester dans le cadre de la subtoxicité du produit.

Nous avons donc décidé d'étudier les effets développementaux d'une dose chronique de CPF plus faible que celle qui avait donné une diminution d'anxiété dans l'expérience de Ricceri et collaborateurs (Ricceri *et al.*, 2006) et de respecter leur moyen d'exposition, soit la voie sous-cutanée appliquée directement chez le jeune, ainsi que le temps d'exposition (4 jours), une fois par jour.

Pour ce faire, nous avons traité les jeunes souris CD1 avec 1 mg/kg.jour par voie sous-cutanée, durant quatre jours à quatre périodes postnatales différentes : PND 1-4, PND 5-8, PND 9-12, PND 13-16. La descendance adulte a été soumise à des tests comportementaux spécifiques, afin de déterminer des modifications persistantes du niveau d'anxiété.

4.2 OBJECTIFS.

Nous voulons mettre en évidence la période sensible à l'exposition chronique subtoxique au CPF pour l'obtention d'une augmentation persistante du niveau d'anxiété chez la souris CD1.

4.3 MATÉRIELS ET MÉTHODES.

4.3.1 ANIMAUX.

Les femelles CD1 en gestation (Laboratoires Charles Rivers, France), âgées de 8 semaines, sont maintenues en cage unique durant 19 jours de gestation (en moyenne) et jusqu'au sevrage des jeunes (PND 21). Un jour après la naissance (PND 1), les portées sont stéréotypées à 4 femelles et 4 males. Après le sevrage, les animaux étant du même sexe et provenant de la même famille sont maintenus dans la même cage. Toutes les souris ont un accès *ad libitum* à l'eau fraîche et la nourriture (Pavan Service, Belgique) et sont maintenues dans des conditions standard de ventilation, de lumière (cycle de 12 heures, lumière allumée à 8 H 00), de température (21°C constant) et d'hygrométrie (50% d'humidité).

Quatre périodes de 4 jours d'exposition postnatale sont réparties de manière homogène au sein des portées : la période 1 : PND 1-4, la période 2 : PND 5-8, la période 3 : PND 9-12, la période 4 : PND 13-16. Pour ce faire, dans une portée, deux périodes d'exposition sont appliquées, avec pour chaque période un membre de la famille exposé au CPF (CPF, DMSO, PBS) et un autre uniquement traité avec le véhicule (animal ayant reçu le même volume de PBS avec le DMSO mais sans le CPF). Chaque famille nous permet donc de réaliser deux périodes d'exposition différentes.

Les tests comportementaux sont réalisés sur la progéniture à l'âge adulte (PND60-70).

4.3.2 PRODUITS.

La solution de CPF est préparée à partir de CPF pur sous forme de poudre (Pestanal, Sigma-aldrich, Bernen- Belgium), qui est d'abord dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) 1%, et ensuite dilué dans une solution tamponnée stérile. Pour des raisons pratiques et de précision (afin d'éviter un volume trop faible ou trop important à piquer en fonction du poids des jeunes), 4 solutions de concentrations différentes de CPF sont utilisées. Par contre, la concentration du solvant DMSO utilisé dans le volume final reste rigoureusement la même (1% du volume) quelque soit la préparation. Pour la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} période d'exposition, les concentrations de CPF sont respectivement de 10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} et 4×10^{-4} mg/ μ l appliquées à des volumes de respectivement 10 μ l/g, 10 μ l/2g, 10 μ l/3g et 10 μ l/4g de poids frais de souris.

Les piqûres sont réalisées le matin, par voie sous-cutanée, dans le pli de la peau de la nuque.

4.3.3 TESTS COMPORTEMENTAUX

Test d'actométrie.

Le test d'actométrie, décrit chapitre 2.3.3.1, est réalisé avec les descendants âgés de deux mois (PND60). Rappelons que dans ce test d'actométrie, l'évaluation du niveau d'activité locomotrice spontanée de la souris se réalise à l'aide de la mesure du nombre de croisements successifs de faisceaux infrarouges opposés en un temps donné (NCSFO). En fonction des moyens techniques, du grand nombre d'animaux à tester et des résultats des tests préliminaires, nous avons fixé cette durée à 30 minutes.

Le “*light/dark box test*”.

Le niveau d'anxiété de la progéniture adulte a été mesurée le dans le « *light and dark box* » ou test des chambres claire et sombre (décrit Chapitre 2.3.3.3) au PND 70. Nous avons utilisé deux critères qui permettent la mesure du niveau de l'anxiété : premièrement, le pourcentage du temps que passe l'animal dans la chambre sombre (ou « *dark box* ») qui est proportionnelle au niveau d'anxiété de la souris, et deuxièmement le nombre de passages d'un compartiment à l'autre (nombre de transitions) qui est inversement proportionnel au niveau d'anxiété de la souris (Bourin and Hascoet, 2003).

Une session se déroule toujours de la même manière : l'animal est introduit dans la pièce et est pesé. Après 5 minutes d'habituation, il est placé seul dans la chambre claire (ou « *light box* »). La souris peut passer librement d'une chambre à l'autre. Au bout de 5 minutes de test, la souris est récupérée et les chambres sont lavées afin que la souris suivante passe le test dans les mêmes conditions que la précédente.

4.4 RÉSULTATS.

L'anxiété développementale liée à une exposition subtoxique au CPF apparaît dépendante du sexe. Nous avons déjà observé ce phénomène dans nos expériences précédentes (chapitres 2 et 3) tant que dans les expériences de Ricceri (Ricceri *et al.*, 2006). Il nous semble donc opportun de présenter les résultats des tests des animaux de chaque sexe séparément.

4.4.1 POIDS.

Indépendamment des périodes d'exposition, le poids des souris mâles âgées de deux mois ($37,0 \pm 0,03$ g) est en moyenne significativement plus élevé que celui des souris femelles ($29,5 \pm 0,03$ g), ce qui est habituel chez cette espèce.

Poids de femelles.

Le poids des souris (voir figure 4.1 et tableau 4.1) est en moyenne légèrement plus élevé chez les femelles exposées au CPF durant les trois premières périodes (PND 1-4 ; PND 5-8 ; PND 9-12), et moins élevé chez les femelles exposées au CPF durant la période la plus tardive (PND 13-16) en comparaison du poids de leurs contrôles respectifs.

L'analyse ANOVA définit un effet 'produit x période d'exposition' très proche de la signification ($F(3, 77)=2,6509$; $p=0,0546$), ce qui signifie qu'il existe au moins au sein d'une période une différence significative entre le poids des animaux exposés et non exposés au CPF. Le LSD de Fisher définit une différence significative entre le poids des souris femelles exposées au CPF et de leurs contrôles ($p=0,0221$) pour la 4^{ème} période d'exposition (PND 13-16).

Une autre manière d'analyser les poids des souris femelles est de le faire séparément pour chacune des périodes d'exposition. L'ANOVA des poids des souris femelles par période détermine qu'il n'y a pas de différence significative entre femelles exposées au CPF et femelles contrôles durant la première période ($F(1, 19)=0,2509$; $p=0,6223$) ; ni pour la seconde période ($F(1, 20)=1,5911$; $p=0,2217$) ; ni pour la troisième période ($F(1, 17)=0,2265$, $p=0,6402$) mais bien pour la quatrième période ($F(1, 21)=5,5618$; $p=0,0281$).

En conclusion, ces résultats suggèrent que l'exposition subtoxique (1 mg/kg.jour) au CPF durant une période tardive du développement du cerveau (PND 13-16) diminue légèrement le poids des souris femelles (de l'ordre de 7,5%), mais uniquement pour cette période périnatale.

Poids des souris mâles.

Le poids des souris mâles exposées au CPF durant la première période d'exposition est plus élevé que chez les souris contrôles ou véhicules (DMSO), alors qu'à l'inverse, le poids des mâles diminue suite à l'exposition au CPF durant les périodes d'exposition 2 (PND 5-8) et 3 (PND 9-12) par rapport au poids de leurs contrôles respectifs (DMSO). Le poids des souris mâles exposées durant la dernière période ne semble pas différent comparé à celui des véhicules (DMSO).

Toutefois, la comparaison du poids des souris mâles en fonction du produit (CPF ou DMSO) et de la période d'exposition ne détermine pas d'effet 'période x produit' ($F(3, 80)=1,8146$; $p=0,1512$).

L'ANOVA du poids des souris mâles pour chaque période ne détermine qu'une tendance à un poids plus important chez les sujets exposés au CPF durant la première période, comparé à celui de leurs véhicules ($F(1, 20)=3,2415$; $p=0,0869$). Par contre, il n'y a pas de différence significative entre le poids des souris mâles véhicules (DMSO) et celui des souris mâles exposées au CPF durant la seconde période ($F(1, 22)=0,1739$; $p=0,6807$), durant la troisième ($F(1, 18)=1,5228$; $p=0,2331$) ou durant la quatrième période ($F(1, 20)=0,0043$; $p=0,9484$).

En conclusion, le CPF n'induirait pas de nettes modifications persistantes du poids des mâles (<5,6% de différence), quelque soit la période d'exposition néonatale de 4 jours.

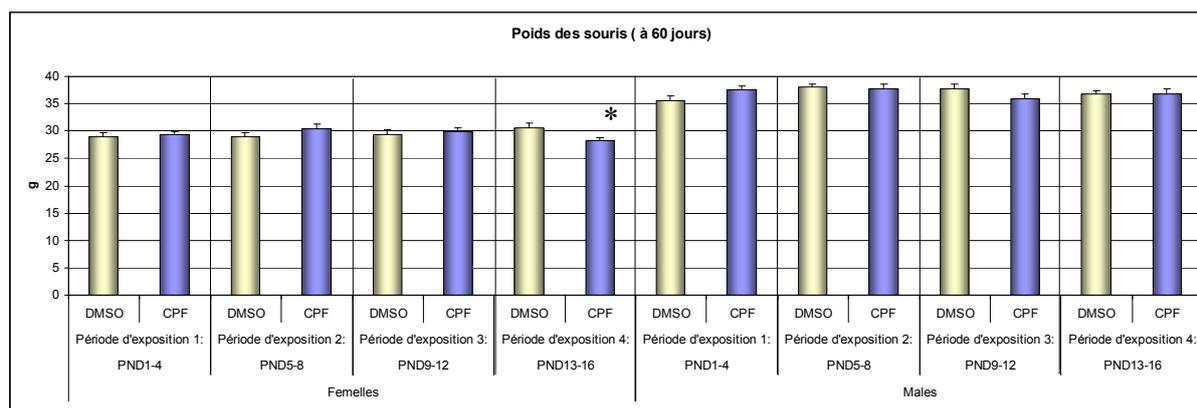


Figure 4.1: Poids des souris (Moyenne \pm ESM) en fonction du produit (en jaune : véhicule ; en bleu CPF), de la période d'exposition et du sexe des souris.

*** : $p < 0,05$: différence significative par rapport au véhicule (DMSO)**

($n=9-12$ par sexe et par groupe d'exposition)

SEXE	période d'exposition	produit	poids	esm	n	
Femelles	1	PND 1-4	DMSO	28,9	0,7	11
		CPF	29,4	0,5	10	
	2	PND 5-8	DMSO	28,9	0,8	11
		CPF	30,4	0,9	11	
	3	PND 9-12	DMSO	29,4	0,8	10
		CPF	29,9	0,6	9	
	4	PND 13-16	DMSO	30,6	0,8	11
		CPF	28,3	0,5	12	
Males	1	PND 1-4	DMSO	35,6	0,9	11
		CPF	37,6	0,6	11	
	2	PND 5-8	DMSO	38,1	0,4	12
		CPF	37,8	0,8	12	
	3	PND 9-12	DMSO	37,6	1,0	9
		CPF	35,9	0,9	11	
	4	PND 13-16	DMSO	36,8	0,6	11
		CPF	36,8	0,9	11	

Tableau 4.1 : moyenne des poids des souris mâles et femelles selon la période d'exposition et le produit d'exposition : CPF (sujets exposés au CPF), DMSO (animaux contrôles : sujets exposés uniquement au DMSO).

4.4.2 MESURE DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE DANS LE TEST D'ACTOMÉTRIE.

Le choix que nous avons fait de séparer la présentation des résultats des souris mâles et femelles s'avère justifié. En effet, l'analyse statistique de l'évolution de l'activité locomotrice des animaux montre une différence significative entre mâles et femelles au cours du temps : $F(5, 785)=2,2821$; $p=0,0449$.

L'activité locomotrice spontanée est déterminée ici par la mesure du nombre de croisements de faisceaux successifs (NCSFO). Les données concernant l'évaluation de cette activité sont représentées graphiquement à la figure 4.2, séparément pour les souris mâles et femelles.

Activité locomotrice spontanée des femelles.

Le niveau d'activité locomotrice spontanée des souris femelles exposées au CPF semble similaire à celui des souris femelles véhicules (DMSO) pour les trois premières périodes d'exposition (PND 1-4, 5-8 et 9-12) et un peu plus bas que celui présenté par les souris véhicules pour la dernière période d'exposition (PND 13-16).

L'ANOVA globale de l'activité des femelles ne détecte pas d'effet 'produit x période' ($F(3, 77)=0,4342$; $p=0,7292$), suggérant qu'il n'y aurait pas d'effet du CPF sur l'activité locomotrice des souris femelles quelque soit la période d'exposition.

L'analyse précise de l'activité pour chacune des périodes d'exposition séparément nous confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre l'activité des animaux exposés au CPF et véhicules quelque soit la période d'exposition.

Nous en concluons qu'une exposition périnatale durant quatre jours consécutifs, quelque soit la période parmi les quatre périodes d'exposition, n'a pas d'effet significatif sur l'activité locomotrice des souris femelles adultes (âgées de 60 jours) dans nos conditions expérimentales.

Activité locomotrice spontanée des mâles.

L'activité locomotrice des souris mâles (figure 4.2) est observée en moyenne plus basse (environ 15%) chez les sujets exposés au CPF que chez les sujets véhicules pour la première (PND 1-4) et la dernière période (PND 13-16). Par contre elle semble très similaire chez les animaux mâles exposés et non exposés (DMSO) pour les deux autres périodes d'exposition.

L'analyse statistique de l'activité par période confirme que la diminution d'activité chez les souris mâles exposées au CPF durant la première période par rapport aux souris véhicules (DMSO) n'est pas significative ($F(1, 20)=0,9016$; $p=0,3537$), mais concerne uniquement la dernière période d'exposition ($F(1, 20)=4,4770$; $p=0,0471$). Les animaux exposés au CPF durant la deuxième période et la troisième période ne montrent pas de différence significative du niveau d'activité locomotrice spontanée comparé aux résultats de leurs contrôles (période 1 : $F(1, 22)=0,4643$; $p=0,5027$; période 2 : $F(1, 18)=0,0304$; $p=0,8635$).

Nous concluons que le CPF produit une diminution de l'activité locomotrice spontanée principalement chez la souris mâle et pour une période d'exposition postnatale allant du jour 13 à 16.

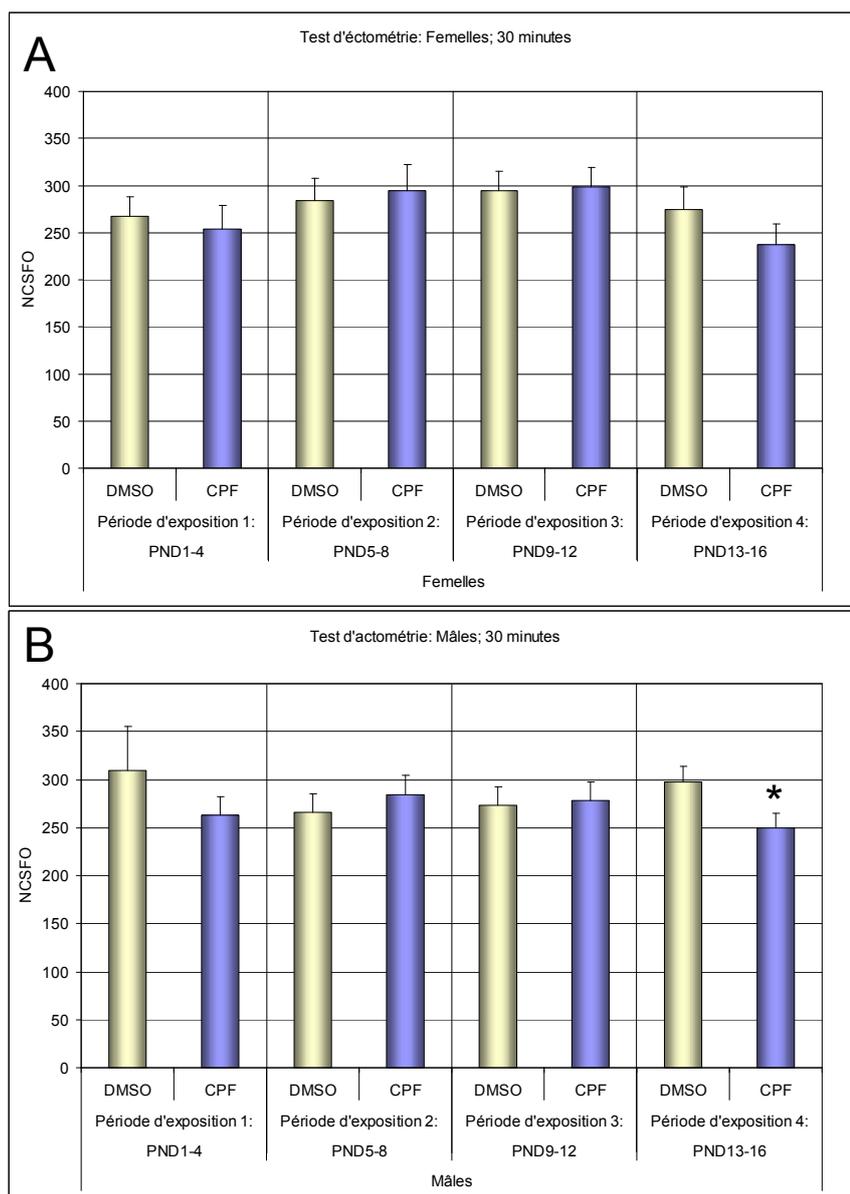


Figure 4.2: Activité locomotrice spontanée (moyenne \pm ESM) dans le test d'actométrie (30 minutes) des souris femelles (A) et mâles (B), en fonction du produit (CPF ou véhicule : DMSO), et en fonction de la période d'exposition. NCSFO : nombre de croisements de faisceaux opposés successifs. *: $p < 0,05$: différence significative par rapport à son groupe véhicule. (n = 9-12 /groupe et sexe)

4.4.3 MESURE DU NIVEAU D'ANXIÉTÉ DANS LE TEST « *LIGHT/DARK BOX* »****

Deux critères sont utilisés ici afin de mesurer le niveau d'anxiété chez les souris : le % de temps passé dans la chambre sombre ou « *dark box* » qui est proportionnel au niveau d'anxiété, et le nombre de changements de compartiments qui est inversement proportionnel au niveau d'anxiété.

Le % de temps passé dans la chambre sombre ou « *dark box* ».

Les souris femelles exposées au CPF durant les périodes 1 (PND 1-4), 2 (PND 5-8) et 4 (PND 13-16) passent plus de temps dans la chambre sombre (entre 7 et 15% de plus) que les souris du groupe de souris véhicules (DMSO). Ce n'est pas le cas lorsque la période d'exposition se situe au PND 9-12 (Figure 4.3 A).

Cependant, les résultats de l'ANOVA montrent que ces différences entre souris femelles exposées et leurs véhicules (DMSO) ne sont pas significatives, quelque soit la période.

[(PND 1-4 : $F(1,19)=0,5031$; $p=0,4868$) ; (PND 5-8 : $F(1,20)=0,6288$, $p=0,4371$) ; (PND 9-12 $F(1,17)=0,0168$; $p=0,8984$) ; (PND 13-16 : $F(1,21)=2,0783$; $p=0,1641$)].

Les souris mâles exposées au CPF passent également un peu plus de temps en moyenne dans la chambre sombre quelque soit la période de traitement (Figure 4.3 B.), mais cette différence n'est pas significative. [(PND 1-4 : $F(1,20)=0,5766$; $p=0,4565$) ; (PND 5-8 : $F(1,22)=0,4911$; $p=0,4908$) ; (PND 9-12 : $F(1,18)=0,7258$; $p=0,4054$) ; (PND 13-16 : $F(1,20)=0,9528$; $p=0,3407$)].

Si on ne tient ni compte du sexe des souris, ni de la période de traitement, les souris exposées au CPF resteraient en moyenne plus longtemps (8% de plus) dans la chambre sombre que les souris contrôles. l'ANOVA détermine que cette différence est significative : $F(1, 157)=5,0496$; $p=0,0260$. Selon nos conditions de test et pour ce critère, le CPF augmenterait très légèrement l'anxiété chez les animaux, indifféremment de la période d'exposition ou du sexe des animaux.

**** En plus des représentations graphiques, les résultats sont également présentés dans le tableau 4.2, p140

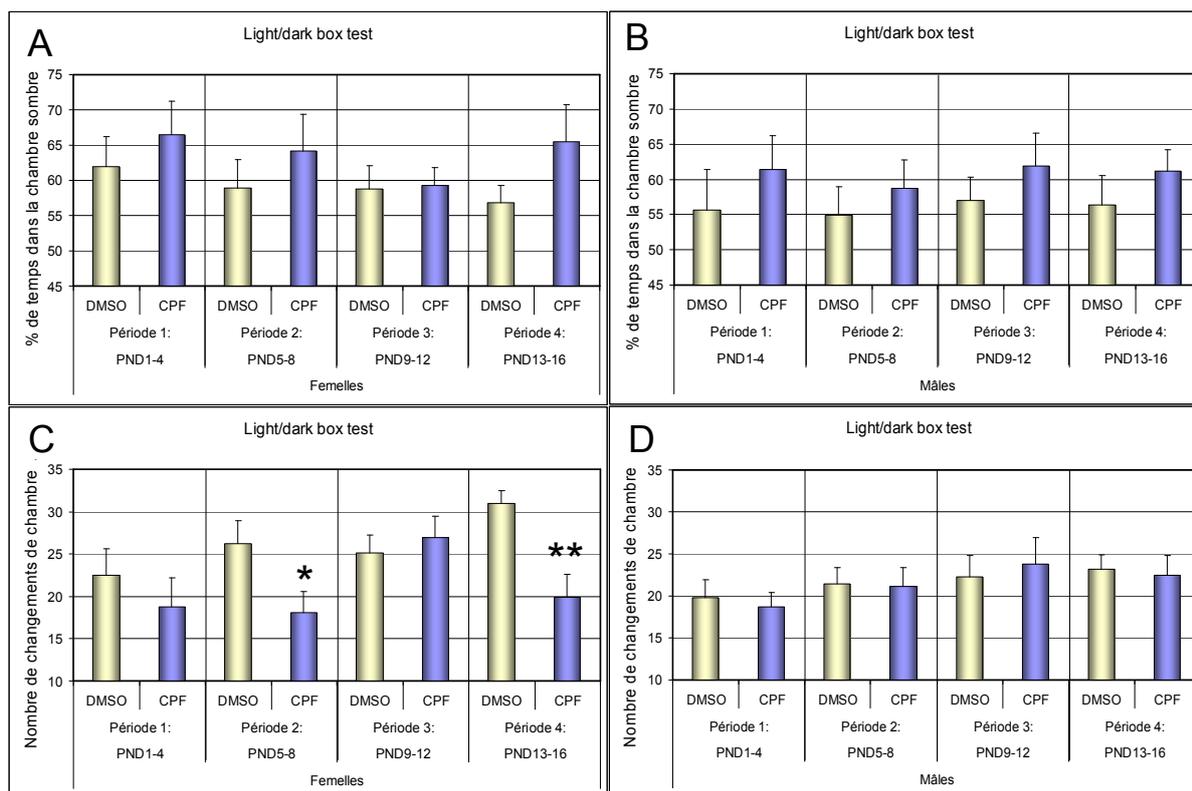


Figure 4.3 : % du temps passé dans le test des chambres claire/sombre ou « light/dark box test », (Moyenne \pm ESM) durant 5 minutes de test, pour les souris femelles (A) et mâles (B). Nombre de changements de chambre (Moyenne \pm ESM) réalisés par les souris femelles (C) et mâles (D).

(*): $p < 0,05$; (**): $p < 0,01$.

SEXE	période d'exposition	produit	% temps dans la chambre sombre ou « <i>dark box</i> »	ESM	Nombre de changements de chambre	ESM	
Femelles	PND 1-4	DMSO	62,00	4,24	22,45	3,18	
		CPF	66,50	4,75	18,80	3,42	
	PND 5-8	DMSO	58,94	4,01	26,18	2,78	
		CPF	64,15	5,21	18,09	2,46	
	PND 9-12	DMSO	58,73	3,40	25,10	2,09	
		CPF	59,30	2,59	26,89	2,55	
	PND 13-16	DMSO	56,82	2,48	31,00	1,50	
		CPF	65,50	5,29	19,92	2,64	
	Mâles	PND 1-4	DMSO	55,61	5,85	19,82	2,12
			CPF	61,36	4,83	18,64	1,76
PND 5-8		DMSO	54,92	3,99	21,42	1,91	
		CPF	58,72	4,03	21,08	2,25	
PND 9-12		DMSO	57,04	3,21	22,22	2,55	
		CPF	61,88	4,71	23,73	3,23	
PND 13-16		DMSO	56,36	4,23	23,18	1,73	
		CPF	61,21	3,04	22,45	2,30	

Tableau 4.2: Temps passé dans la chambre sombre et nombre de changements de chambre chez les souris femelles et mâles contrôles (DMSO) et traitées au CPF (CPF) aux différentes périodes d'exposition dans le test des chambres claire/sombre ou « *light/dark box test* ».

Le nombre de changements de chambre.

La moyenne du nombre de passages d'une chambre à l'autre est plus petite chez les souris femelles exposées au CPF que chez les animaux contrôles, pour toutes les périodes d'exposition sauf la période PND 9-12, où elle est sensiblement la même sinon un peu plus élevée chez les souris femelles exposées au CPF par rapport aux souris contrôles (DMSO) (Figure 4.3.C.). L'ANOVA comparant le nombre de changements de chambre pour chaque période d'exposition au CPF détermine que ces différences sont non significatives pour la période d'exposition PND 1-4 : $F(1,19)=0,6141$; $p=0,4429$ et pour la période d'exposition PND 9-12 : $F(1,17)=0,2990$; $p=0,5916$ et que ces différences sont significatives pour la période d'exposition PND 5-8 : $F(1,20)=4,7545$; $p=0,0413$ et pour la période d'exposition PND 13-16 : $F(1,21)=12,709$; $p=0,0018$.

Concernant les souris mâles, le nombre de changements de compartiments semble très similaire en moyenne entre souris exposées et contrôles, quelque soit la période de traitement (Figure 4.3 D). L'ANOVA factorielle par période confirme que ces moyennes entre souris mâles exposées et leur souris contrôles (DMSO) ne sont pas différentes, que ce soit pour la période d'exposition PND 1-4 ($F(1,20)=0,18374$; $p=0,6728$), pour la période PND 5-8 ($F(1,22)=0,0139$; $p=0,9073$), pour la période PND 9-12 ($F(1,18)=0,13845$; $p=0,7142$), ou pour la période PND 13-16 ($F(1, 20)=0,0704$; $p=0,7935$).

Donc, les seules périodes postnatales qui permettent au CPF de diminuer le nombre de changements de compartiments est la période PND 5-8 (diminution d'un ordre de 31%) et surtout la période d'exposition PND 13-16 (diminution de 36%), et ceci uniquement chez les souris femelles.

Etant donné qu'il n'existe pas de diminution significative de l'activité des souris femelles exposées au CPF dans le test d'actométrie, nous pouvons valider cette diminution du nombre de changements de compartiments comme étant liée à une augmentation du niveau de l'anxiété.

En conclusion, la mesure de l'anxiété dans le test des chambres claire/sombre suggère qu'une exposition au CPF durant la période postnatale tardive (PND 13-16) et dans une moindre mesure une exposition au CPF durant la période PND 5-8 augmenteraient le niveau d'anxiété chez les souris femelles adultes et pas chez les souris mâles. Un petit effet anxiolytique de la première période d'exposition au CPF est observable, mais n'est pas du tout significatif. La période PND 9-12 constituerait la seule exposition au CPF qui donnerait quelques signes

contraires dans le sens de la modification du niveau d'anxiété, quoique ces effets ne soient pas significatifs.

4.5 DISCUSSION

Premièrement, nous avons pu mettre en évidence que quatre jours d'exposition à 1 mg/kg.jour de CPF et par voie sous-cutanée sont capables de produire une élévation persistante du niveau d'anxiété chez la souris CD1.

Deuxièmement, nous confirmons que cet effet est dépendant du sexe puisqu'il n'apparaît que chez les souris du sexe femelle (et non chez les souris mâles).

Troisièmement, nous devons préciser que l'intensité de l'effet anxiogène du CPF dépend de la période d'exposition. En effet, avec notre niveau d'exposition, soit 1 mg/kg.jour par voie sous-cutanée, le CPF élève le niveau d'anxiété chez la souris femelle CD1 si l'exposition se déroule durant les deux périodes d'exposition postnatales PND 13-16 et PND 5-8, et cette augmentation est très légère pour une exposition durant les premiers jours de vie (PND 1-4). Par contre nous avons observé une très légère tendance à un effet opposé pour la période d'exposition PND 9-12 (sous forme d'une augmentation du nombre de passages dans le test des chambres claire et sombre).

Si chez la souris femelle aucune altération nette du niveau d'activité locomotrice spontanée n'a été décelée, nous avons constaté une hypoactivité pour la période d'exposition la plus tardive au CPF chez les souris mâles. Pour la même dose (1 mg/kg.jour), et pour une exposition de 4 jours également et à la fin de la seconde semaine Ricceri et ses collaborateurs (Ricceri *et al.*, 2006) n'ont pas observé de variation significative du niveau d'activité locomotrice chez les souris mâles mais juste une petite diminution sur 20 minutes. Par contre, dans leur expérience, une hyperactivité significative est décrite chez les souris mâles à la dose la plus forte (3 mg/kg.jour), pour la même période d'exposition.

Il semblerait donc que le CPF en doses subtoxiques ne modifierait pas le niveau d'activité des souris femelles pour une période de 4 jours d'exposition postnatale située entre la naissance et le PND 16. Par contre, le CPF altérerait de manière persistante le niveau d'activité locomotrice spontanée des souris mâles si l'exposition se déroule à la fin de la seconde semaine. Cette altération n'irait pas dans le même sens en fonction de la dose : des doses faibles d'1 mg/kg de CPF diminueraient le niveau d'activité alors que des doses plus fortes (3 mg/kg) l'augmenteraient.

Si nous comparons de manière grossière nos résultats (effet anxiogénique du CPF) avec ceux des expériences de Ricceri et collaborateurs (effet anxiolytique du CPF), nous pourrions conclure à des effets opposés sur le sens d'altération de l'anxiété chez la souris femelle, et à contredire les résultats obtenus par l'équipe de Ricceri (Ricceri *et al.*, 2006). Par contre, en examinant plus précisément les résultats de chacun en fonction de la dose utilisée et de la période d'exposition, nous pouvons à la fois appuyer certaines idées de Ricceri et collaborateurs à propos de la période sensible au CPF pour la diminution du niveau d'anxiété et apporter d'autres renseignements quant à la limite de la dose qui donne une diminution du niveau d'anxiété. En effet, Ricceri et collaborateurs suggèrent que la fin de la deuxième semaine après la naissance (PND 11-14) représente une période particulièrement sensible au CPF pour l'obtention d'une diminution du niveau d'anxiété, à condition que la dose soit au dessus d'un certain seuil. En effet, la diminution d'anxiété est significative si le niveau d'exposition est à 3 mg/kg et pas pour la dose plus basse de 1 mg/kg.jour pour laquelle seulement une tendance est observée. Dans notre expérience, pour la période d'exposition presque similaire (PND 9-12), les souris femelles ne présentent qu'une légère tendance à la diminution du niveau d'anxiété. C'est la seule période pour laquelle nous n'avons pas obtenu une augmentation du niveau d'anxiété.

Nous concluons qu'ensemble, ces résultats suggèrent que l'effet développemental anxiolytique du CPF en doses subtoxiques est dépendant de la dose, à condition que l'exposition se situe durant une période critique bien précise, située à la fin de la deuxième semaine après la naissance.

Par contre pour les périodes postnatales situées avant et après cette période critique, et dans une moindre mesure durant les premiers jours après la naissance, nous avons obtenu une augmentation du niveau d'anxiété chez la souris femelle, mais toujours pour un faible niveau d'exposition, bien en dessous de celui qui a donné une diminution du niveau d'anxiété dans les expériences publiées par Ricceri et collaborateurs (Ricceri *et al.*, 2006).

Il semblerait donc évident que plusieurs mécanismes de toxicité développementale seraient impliqués dans l'altération du niveau d'anxiété par le CPF. Certains mécanismes, qui surviendraient tout au long du développement postnatal et pour des doses de CPF sous un certain seuil d'exposition chronique proche de 1 mg/kg.jour par voie sous-cutanée, seraient responsables d'une augmentation de l'anxiété. Par contre, l'exposition subtoxique au CPF durant une période critique située durant la fin de la seconde semaine postnatale impliquerait d'autres mécanismes de toxicité développementale dont les perturbations mèneraient à une

diminution persistante du niveau d'anxiété à partir d'un seuil d'exposition situé juste au dessus de 1 mg/kg.jour et dont l'intensité augmenterait avec la dose. Nous discuterons plus loin (chapitre 6) des mécanismes produits par le CPF et qui pourraient être impliqués dans l'occurrence de ces troubles de l'anxiété.

Nous avons de nouveau montré que le CPF pouvait produire une hypoactivité chez les souris mâles, principalement pour une période d'exposition postnatale tardive (PND 13-16). Dans les chapitres 2 et 3, nous avons montré qu'une période longue d'exposition au CPF, à de faibles doses subtoxiques mais de longue durée (GD 15-PND 14) était capable d'induire de l'hypoactivité uniquement chez les souris mâles également.

Les données concernant les effets produits par des périodes d'exposition au CPF sur l'activité locomotrice (sur une heure) montrent essentiellement une atténuation de l'habituation dans le labyrinthe en 8 chez les rats des deux sexes pour une période d'exposition en milieu de gestation, et uniquement chez les rats femelles pour une période d'exposition en fin de gestation. Il est observé également une hypoactivité chez les rats des deux sexes lors d'une exposition au CPF durant le milieu de la gestation pour la dose la plus élevée (5 mg/kg.jour vs 1 mg/kg) (Levin *et al.*, 2002; Aldridge *et al.*, 2004). Une période postnatale PND 1-4 de traitement au CPF (1 mg/kg) produit une hypoactivité chez les rats mâles sur 60 minutes et non chez les rats femelles, alors que la période PND 11-14 ne produit plus de modification de l'activité locomotrice chez les rats adolescents (PND 21)(Dam *et al.*, 2000).

Ricceri et collaborateurs obtiennent une production d'hyperactivité locomotrice chez la souris, mais uniquement pour des doses plus élevées (6 mg/kg vs 3 mg/kg) et uniquement pour la période des quatre derniers jours de gestation (Ricceri *et al.*, 2003; Ricceri *et al.*, 2006).

Il semblerait donc que non seulement les périodes sensibles pour l'obtention d'altération de l'activité locomotrice spontanée par le CPF soient différentes chez le mâle et la femelle, mais aussi que la dose ait un effet déterminant sur le sens de l'altération de l'activité des souris. En effet, des doses les plus proches de la limite de la toxicité produisent de l'hyperactivité alors que des doses plus faibles produisent une altération de l'habituation et une hypoactivité principalement chez le mâle.

CHAPITRE 5 :

« ETUDE DE L'IMPLICATION DU
SYSTÈME SÉROTONINERGIQUE DANS
L'ANXIÉTÉ DÉVELOPPEMENTALE AU

CPF :

LES RÉCEPTEURS 5HT_{1A} »

5 ETUDE DE L'IMPLICATION DU SYSTÈME SÉROTONINERGIQUE DANS L'ANXIÉTÉ DÉVELOPPEMENTALE AU CPF : LES RÉCEPTEURS 5HT_{1A}

5.1 INTRODUCTION

L'exposition chronique subtoxique au CPF durant une partie du développement du cerveau est capable de modifier le niveau d'anxiété de manière persistante chez les rongeurs et ceci de manière différente en fonction du sexe des animaux. En particulier, 4 jours d'exposition directe (voie sous-cutanée) à 3 mg/kg.jour en fin de la seconde semaine après la naissance (PND 11-14) suffisent à diminuer de manière significative et persistante le niveau d'anxiété des souris femelles CD1 (et non des souris mâles) (Ricceri *et al.*, 2006). A l'opposé, une exposition à des doses subtoxiques d'1 mg/kg *in utero* et durant la lactation (GD 15 à PND 14) représentant un niveau d'exposition plus bas mais de longue durée, augmente le niveau d'anxiété des souris femelles CD1 (voir chapitre 3). L'utilisation de 4 jours d'exposition à 1 mg/kg.jour par voie sous-cutanée à différentes périodes postnatales a permis de confirmer une période critique de sensibilité entraînant une diminution persistante du niveau d'anxiété chez la souris, située à la fin de la seconde semaine postnatale et a montré qu'en dehors de cette période, l'exposition au CPF en doses subtoxiques très basse (1 mg/kg) produit un effet anxiogénique persistant (voir chapitre 4).

Les mécanismes qui régulent le niveau d'anxiété sont de multiples natures. Certains d'entre eux ont été mis en évidence par l'utilisation de drogues anxiolytiques chez l'Homme et dans les modèles animaux. Dans ce cadre, les benzodiazépines sont des agonistes stimulants des récepteurs du système GABAergique (récepteurs GABA_A). Si ce système GABAergique représente la principale voie d'inhibition du système nerveux central (par un mécanisme d'influx d'ions chlore), une diminution de son activité mène à l'élévation du niveau d'anxiété. La surstimulation de ces récepteurs par les benzodiazépines rectifierait cette modification et représenterait donc un des mécanismes anxiolytiques. Ce type de mécanisme anxiolytique est dû à l'activation de récepteurs des benzodiazépines dit « centraux », de type GABAergique et qui se trouvent dans la membrane plasmique des neurones du SNC.

Un autre type de récepteur aux benzodiazépines dit « périphérique » existe. Il s'agit d'un complexe protéinique, nommé MBR (récepteur mitochondrial aux benzodiazépines) ou $\omega 3$ ou site π , situé sur la membrane externe mitochondriale au niveau de nombreux tissus. Le rôle de ces récepteurs périphériques serait à l'origine de nombreux effets secondaires de cette famille d'anxiolytiques (Krueger, 1995). Ces MBR sont plus particulièrement présents dans les cellules produisant des stéroïdes : les cellules surrénaliennes, placentaires, testiculaires et ovarienne mais aussi les cellules gliales (Papadopoulos *et al.*, 2006) et leur stimulation par les benzodiazépines augmente la production des stéroïdes, en favorisant la première étape de leur synthèse : la production de prégnénone à partir du cholestérol (Krueger and Papadopoulos, 1990). Ces hormones stéroïdiennes : l'allopregnanolone, la progestérone, l'œstradiol ont une action anxiolytique (Auger and Forbes-Lorman, 2008; Frye *et al.*, 2008; Walf *et al.*, 2008; Gangitano *et al.*, 2009). En particulier, la stimulation des MBR de la membrane mitochondriale des cellules gliales du SNC favorise la production de prégnénone à partir de cholestérol qui est libérée sous forme d'allopregnanolone. Ce neurostéroïde glial stimule les récepteurs GABAergiques ($GABA_A$ -R) des neurones postsynaptiques et induit de cette manière un effet anxiolytique (Papadopoulos *et al.*, 2006).

L'alprazolam, un anxiolytique de la famille des benzodiazépines, est un agoniste du complexe récepteur GABAergique de type A ($GABA_A$ -R) dit « central » car situé sur la membrane plasmique des neurones du SNC. La liaison de l'alprazolam aux récepteurs $GABA_{(A)}$ neuronaux centraux favorise l'inhibition de nombreux systèmes de neurotransmetteurs dans le cerveau, en réduisant l'activité globale du SNC (Atack, 2003). L'alprazolam est défini comme un agoniste total, c'est-à-dire qu'il est agoniste de tous les sous-types de récepteurs GABAergiques (alpha 1, 2, 3 et 4). Cela lui permet d'être un anxiolytique puissant (liée à l'activation des sous-types alpha 2 et/ou 3) mais lui attribue aussi d'autres actions secondaires, comme une action sédatrice (liée à l'activation du sous-type alpha 1) (Atack, 2003; Reynolds *et al.*, 2003). L'alprazolam se fixe également sur les récepteurs GABA de type périphérique et peut donc également produire des effets anxiolytiques indirects via la production de neurostéroïdes par les cellules gliales (Arvat *et al.*, 2002; Papadopoulos *et al.*, 2006).

L'anxiété pathologique est également liée à une altération du système sérotoninergique (Murphy, 1990; Griebel, 1995; Belzung, 2001). De nombreuses preuves scientifiques le montrent. En effet, des drogues stimulant la neurotransmission sérotoninergique sont capables de diminuer les troubles de l'anxiété et l'occurrence des comportements anxieux, soit en

diminuant la récupération de la sérotonine, soit en stimulant directement les récepteurs sérotoninergiques postsynaptiques (Lucki *et al.*, 1994). En particulier, des effets anxiolytiques sont observés lors de la stimulation des récepteurs 5HT_{1A} par des agonistes spécifiques (De Vry, 1995). Chez l'Homme, un hypofonctionnement des récepteurs 5HT_{1A} a été mis en évidence chez les personnes souffrant de troubles de l'anxiété (Lesch, 1991). Les rats souffrant de stress et de troubles d'anxiété montrent également une diminution du taux des récepteurs 5HT_{1A} dans l'hippocampe (CA1, CA3) (McKittrick *et al.*, 1995). Chez les souris également, l'augmentation du niveau de l'anxiété est associée à une diminution du nombre ou de l'activité des récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques (Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998). Les modèles de souris knockout sous-exprimant les récepteurs 5HT_{1A}, ont confirmé que la diminution ou l'absence de récepteurs 5HT_{1A} produisait une élévation du niveau d'anxiété (Heisler *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Sibille *et al.*, 2000; Klemenhagen *et al.*, 2006). A l'inverse, des souris transgéniques sur-exprimant les récepteurs 5HT_{1A} présentent une réduction du niveau d'anxiété (Kusserow *et al.*, 2004). Les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1A} sont de deux types, présynaptiques et postsynaptiques. Les récepteurs 5HT_{1A} présynaptiques sont présents dans le noyau du raphé et leur activation inhibe la synthèse de sérotonine (Blier *et al.*, 1988; Albert *et al.*, 1990) alors que les récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques sont en grande densité dans l'hippocampe (régions CA1, CA3, et gyrus dentelé), le septum latéral, le cortex et l'amygdale (Pazos and Palacios, 1985; Chalmers and Watson, 1991; Pompeiano *et al.*, 1992). Les deux types de récepteurs 5HT_{1A} présynaptiques (dans le raphé) et postsynaptiques paraissent impliqués dans le développement de troubles de l'anxiété (Albert and Lemonde, 2004; Leonardo and Hen, 2008).

L'expression et l'activité des transporteurs de la sérotonine peuvent également avoir une influence sur l'activation des récepteurs 5HT_{1A}. En utilisant des souris transgéniques (déficiante en transporteur de sérotonine par désactivation du gène *htt*), il a été démontré que plus le niveau d'expression des transporteurs de la sérotonine est bas, moins les récepteurs 5HT_{1A} sont stimulés et plus le niveau d'anxiété sera élevé et les comportements anxieux présents (Holmes *et al.*, 2003a; Holmes *et al.*, 2003b).

Le buspirone est un agoniste partiel des récepteurs sérotoninergiques de type 5HT_{1A}. Il est utilisé comme anxiolytique chez l'Homme (Majercsik *et al.*, 2003) et est efficace également chez le rat et la souris (Young and Johnson, 1991; Hata *et al.*, 2001). En effet, dans le labyrinthe en croix surélevé (« *elevated plus maze* »), le buspirone augmente le nombre

d'entrées et le % de temps passé dans les bras ouverts chez la souris (Jung *et al.*, 2006; Grundmann *et al.*, 2007).

L'utilisation de souris transgéniques 5HT_{1A}-R KO « conditionnel », c'est-à-dire dont l'expression des récepteurs peut être réactivé à un moment durant le développement (Gross *et al.*, 2002) a permis de déterminer que l'établissement d'un niveau d'anxiété normal chez l'adulte requiert une expression de ces récepteurs 5HT_{1A} durant le début de la vie postnatale. En effet, la réactivation de ces récepteurs après le jour 21 ne permet pas à la souris transgénique de restaurer un niveau normal proche de celui des souris *wild type*, alors qu'une réactivation dans les premières semaines de vie et avant le jour 21 procure à ces souris un niveau d'anxiété normal (Santarelli *et al.*, 2003). L'altération de la mise en place du système sérotoninergique et en particulier des récepteurs de type 5HT_{1A} durant les premières semaines de vie chez les rongeurs peut donc être à l'origine de troubles de l'anxiété.

L'exposition à des doses subtoxiques chroniques de CPF durant différentes périodes du développement du cerveau est capable de perturber la mise en place du système sérotoninergique chez les rongeurs (Raines *et al.*, 2001; Aldridge *et al.*, 2003; Aldridge *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005b; Slotkin and Seidler, 2005) et en même temps induire des troubles comportementaux comme des modifications de l'activité chez le rat (Slotkin and Seidler, 2007b; Slotkin and Seidler, 2007c), mais aussi des troubles de l'anxiété et de la dépression chez le rat (Aldridge *et al.*, 2005a).

Par toutes ces données issues de la littérature, nous émettons l'hypothèse que l'augmentation de l'anxiété par une exposition subtoxique chronique de type long, durant la fin de la gestation et les deux premières semaines de vie, pourrait être liée à une perturbation de la mise en place du système sérotoninergique, en particulier des récepteurs sérotoninergiques de type 1A (5HT_{1A}R).

Notre but est donc de vérifier si les récepteurs 5HT_{1A} sont impliqués dans l'anxiété développementale liée au CPF. Pour ce faire nous allons comparer chez la progéniture adulte l'efficacité anxiolytique de deux substances utilisant des voies différentes : d'une part l'alprazolam dont le mécanisme joue principalement via l'activation du système inhibiteur GABAergique central et indirectement par la stimulation de la synthèse de stéroïdes et d'autre part le buspirone dont le mécanisme anxiolytique se fait spécifiquement via les récepteurs 5HT_{1A}.

Nous avons exposés des souris CD1 *in utero* et durant la lactation (GD 15-PND 14) à des doses subtoxiques chroniques de CPF (1 mg/kg.jour, gavage des mères, dilution dans huile de maïs) ou à l'huile de maïs uniquement (souris contrôles ou véhicules) afin de produire respectivement des souris femelles anxieuses et des souris contrôles. Le niveau d'anxiété des jeunes souris femelles exposées au CPF (CPF) et contrôles (VEH) a été mesuré à l'âge adulte dans un labyrinthe en croix surélevé. Lors de ce test nous avons imposé aux souris femelles de chaque famille deux anxiolytiques de type différent. En effet, une souris a été soumise à l'effet d'un anxiolytique agoniste des récepteurs 5HT_{1A}, le buspirone, alors qu'une autre souris a été traitée avec l'alprazolam. Les mesures des effets anxiolytiques du buspirone et de l'alprazolam sur les souris exposées au CPF doivent respectivement nous informer sur le niveau d'activité des récepteurs 5HT_{1A} et nous permettre de vérifier qu'un effet anxiolytique est possible. Une action anxiolytique efficace de l'alprazolam dans le labyrinthe en croix surélevé peut fournir également une preuve supplémentaire que l'augmentation de l'anxiété mesurée dans ce test est bien réelle.

5.2 OBJECTIFS

Nous désirons mettre en évidence l'implication des récepteurs 5HT_{1A} dans l'anxiété développée chez les souris adultes après une exposition périnatale subtoxique au CPF.

5.3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

5.3.1 SUBSTANCES ET DROGUES.

L'insecticide chlorpyrifos : la solution de CPF est fabriquée à partir de chlorpyrifos pur sous forme de poudre (©Pesnata, Sigma-Aldrich) diluée directement dans de l'huile de maïs (Sigma-Aldrich). La concentration est choisie afin de fournir 1 mg/kg de poids vif de souris dans un volume de 100 µl/g de poids vif de souris.

Les anxiolytiques : l'alprazolam qui se trouve à l'origine sous forme de poudre pure (Alprazolam hydrochloride, Sigma Aldrich) est dilué dans de la saline stérile, qui est ensuite filtrée (maille 2µm). La concentration est calculée afin de fournir 0,2 mg par kg de poids vif de souris, pour un volume final de 100 µl/ 30g de poids vif de souris.

Le buspirone sous forme de poudre pure (Sigma-Aldrich) est dilué dans la saline stérile afin de fournir 10 mg/kg de poids vif de souris dans un volume de 100 µl par 30g de poids vif de souris.

Les doses, volumes et routes sont adaptées de ceux du protocole de Hata et collaborateurs (Hata *et al.*, 2001) et en fonction de travaux préliminaires.

5.3.2 ANIMAUX ET TRAITEMENTS

Les femelles CD1 (Laboratoire Charles River, France) âgées de 8 semaines sont maintenues seules dès la seconde semaine de gestation dans une cage en plastique transparent. Les conditions standard de lumière (cycle de 12 heures, allumage à 8H00 AM), de température (21°C constant) et d'humidité (60%) sont respectées. Chaque jour est vérifié qu'eau fraîche et nourriture soient disponibles *ad libitum*.

Les familles sont limitées à 4 femelles et 4 mâles le jour de la naissance. Les deux sexes opposés sont séparés après le sevrage (PND 20) et les représentants de chaque famille sont maintenus ensemble dans la même cage.

Les mères sont traitées par gavage, une fois par jour (le matin), soit à une dose de la solution de CPF (1 mg/kg de poids vif, 100 µl/40 g), soit avec l'huile de maïs (100 µl/40 g de poids vif). Ce traitement débute le 15^{ème} jour de gestation et se termine le 14^{ème} jour après la naissance (GD 15-PND 14). Deux groupes sont donc créés : un groupe de souris exposées au CPF (CPF) et un groupe de souris non exposées au CPF mais gavées avec l'huile uniquement (VEH).

5.3.3 LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ

Ce labyrinthe en croix surélevé (« *Elevated plus maze* », EPM) est décrit au chapitre 2.3.3.3. L'évaluation du niveau de l'anxiété des souris se réalise par l'analyse du pourcentage de temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps total passé dans le labyrinthe (5 minutes) et par le % du nombre d'entrées dans les bras ouverts par rapport au nombre d'entrées totales. Le % de temps passé dans les bras ouverts et le nombre d'entrées dans les bras ouverts sont proportionnels au niveau d'anxiété (Carobrez and Bertoglio, 2005).

Le test est réalisé au PND80, lorsque ces souris sont adultes.

Procédure du test.

Une heure avant le test, au sein de chaque famille, une femelle est traitée par piqure intrapéritonéale (i.p.) à la solution de l'anxiolytique Alprazolam, une autre à la solution de Buspirone et une troisième à la saline (100 µl/30 g de poids vif). La procédure pour l'utilisation de la buspirone comme anxiolytique (i.p., 60 minutes avant le test) et la dose employée (10 mg/kg dans la saline) ont été choisies sur base des résultats probants trouvés dans la littérature, employant également des souris et le même test d'anxiété (Hata *et al.*, 2001).

L'utilisation de l'alprazolam est très classique dans les expériences de mesure du niveau d'anxiété des souris et se fait par une multitude de voies et concentrations. Une dose de 0,1 mg à 1 mg/kg en i.p. suffit à produire un effet anxiolytique chez la souris (Kulkarni and Sharma, 1993). Afin de ne pas produire un effet sédatif de l'alprazolam sur les souris, nous avons effectué des tests préliminaires sur des souris contrôles et déterminé un protocole efficace de traitement (0,2 mg/kg en i.p. ; 60 minutes avant le test).

Chaque souris est introduite dans la pièce d'expérimentation durant 5 minutes d'acclimatation avant que débute le test du labyrinthe en croix surélevé.

5.3.4 TEST D'ACTOMÉTRIE.

Les souris passent un test d'actométrie de 5 minutes décrit au chapitre 3 (2.6, p 114)

5.4 RÉSULTATS

5.4.1 POIDS DES ANIMAUX.

Il n'y a pas de différence significative entre le poids des souris femelles exposées ou non au CPF ($F(1, 48)=2,2058$; $p=0,1440$). Il n'y a pas non plus de différence de poids des souris femelles en fonction du groupe d'exposition et de l'anxiolytique reçu ($F(2, 48)=,4408$; $p=0,6461$). L'exposition au CPF ne modifierait donc pas le poids des femelles et les groupes formés aléatoirement sont donc bien homogènes quant à leur poids.

5.4.2 ACTIVITÉ LOCOMOTRICE DES FEMELLES.

Les souris femelles ne présentent aucune différence dans leur activité locomotrice, qu'elles soient ou non exposées au CPF ($F(1, 18)=0,3015$, $p=0,5896$).

5.4.3 MESURE DU NIVEAU D'ANXIÉTÉ DANS LE LABYRINTHE EN CROIX SURÉLEVÉ.

Le % du temps passé dans les bras ouverts.

La moyenne du % de temps (Figure 5.1) passé par les souris femelles salines (n'ayant reçu aucun anxiolytique) exposées à 1 mg/kg de CPF périnatalement ($13,21 \pm 1,27$ %) est significativement plus basse que celle des souris femelles véhicules (n'ayant pas reçu de CPF) saline ($23,80 \pm 0,76$ %) : Dunnett CPF 1 mg < VEH : $p=0,045$. Cette différence dans ce critère de temps passé dans les bras ouverts montre un effet anxiogénique de l'exposition périnatale au CPF.

Le % de temps passé par les souris femelles exposées au CPF et traitées à l'alprazolam ($18,96 \pm 1,35$ %) remonte à un niveau proche de celui des souris véhicules salines ($23,80 \pm 0,76$ %). En effet, il n'y a plus de différence significative dans ce critère entre les souris de ces deux groupes (Dunnett CPF « alprazolam < VEH salin » : $p=0,39$). Par contre, le traitement au buspirone ne remonte pas le % du nombre d'entrées dans les bras ouverts des souris traitées à 1 mg/kg de CPF ($6,96 \pm 0,64$ %). En effet le % de temps passé par les souris femelles exposées au CPF et traitées au buspirone reste significativement plus bas que celui des souris non exposées au CPF et non traitées à un anxiolytique (VEH saline) : Dunnett : 'CPF1 mg buspirone < VEH salin' : $p=0,001$.

(Rmq. Le % du temps passé dans les bras ouverts chez les souris véhicules n'augmente pas par traitement de la buspirone ($21,37 \pm 0,92$ %) et augmente de manière non significative (Dunnett : « alprazolam > salin » : $p=0,13$) chez les animaux de ce groupe traités à l'alprazolam ($31,77 \pm 1,21$ %).)

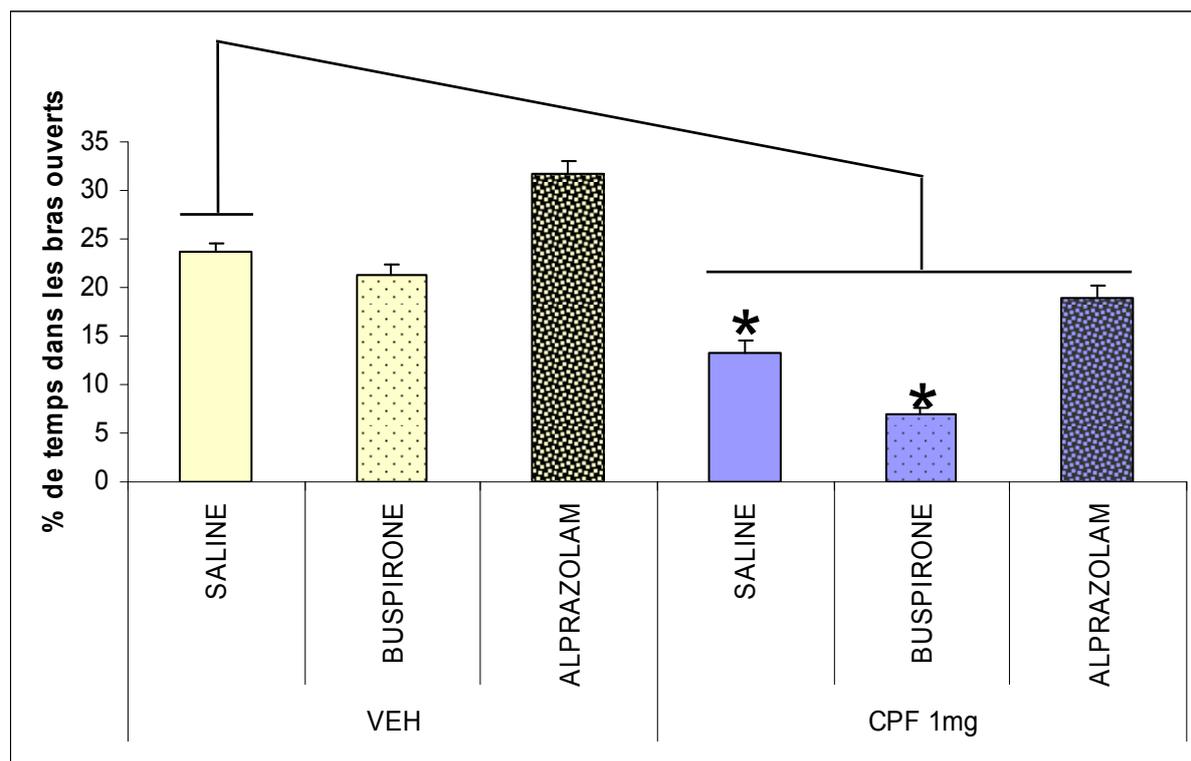


Figure 5.1 : le % de temps (moyenne ± ESM) passé dans les bras ouverts par rapport au temps total du test (5 minutes) des souris CD1 femelles contrôles (VEH) ou exposées au CPF et ayant reçu une solution saline (saline) ou un anxiolytique (buspirone et alprazolam) .

VEH : n=10 par traitement, CPF 1 mg/kg : n=8 par traitement anxiolytique.

*** : différence significative ($p < 0,05$) versus VEH salin**

Le % du nombre d'entrées dans les bras ouverts.

Les souris femelles traitées périnatalement au CPF (saline) présentent en moyenne un % du nombre d'entrées dans les bras ouverts ($20,58 \pm 1,77\%$) plus bas que celui des souris véhicules salines ($38,09 \pm 1,18\%$) (figure 5.2), et cette différence est significative (Dunnett « CPF<VEH » : $p < 0,01$). Le % de nombre d'entrées chez les souris femelles exposées au CPF et traitées au buspirone ($20,65 \pm 1,49\%$) reste bien en dessous de celui des souris femelles véhicules salines ($38,09 \pm 1,18\%$) et de manière toujours très significative (Dunnett « CPF<VEH » : $p < 0,01$) alors que la moyenne des souris femelles exposées à l'alprazolam ($30,94 \pm 1,90\%$) remonte à un niveau auquel il n'existe plus de différence significative avec la moyenne des souris femelles véhicules salines (Dunnett « CPF<VEH » : $p = 0,31$).

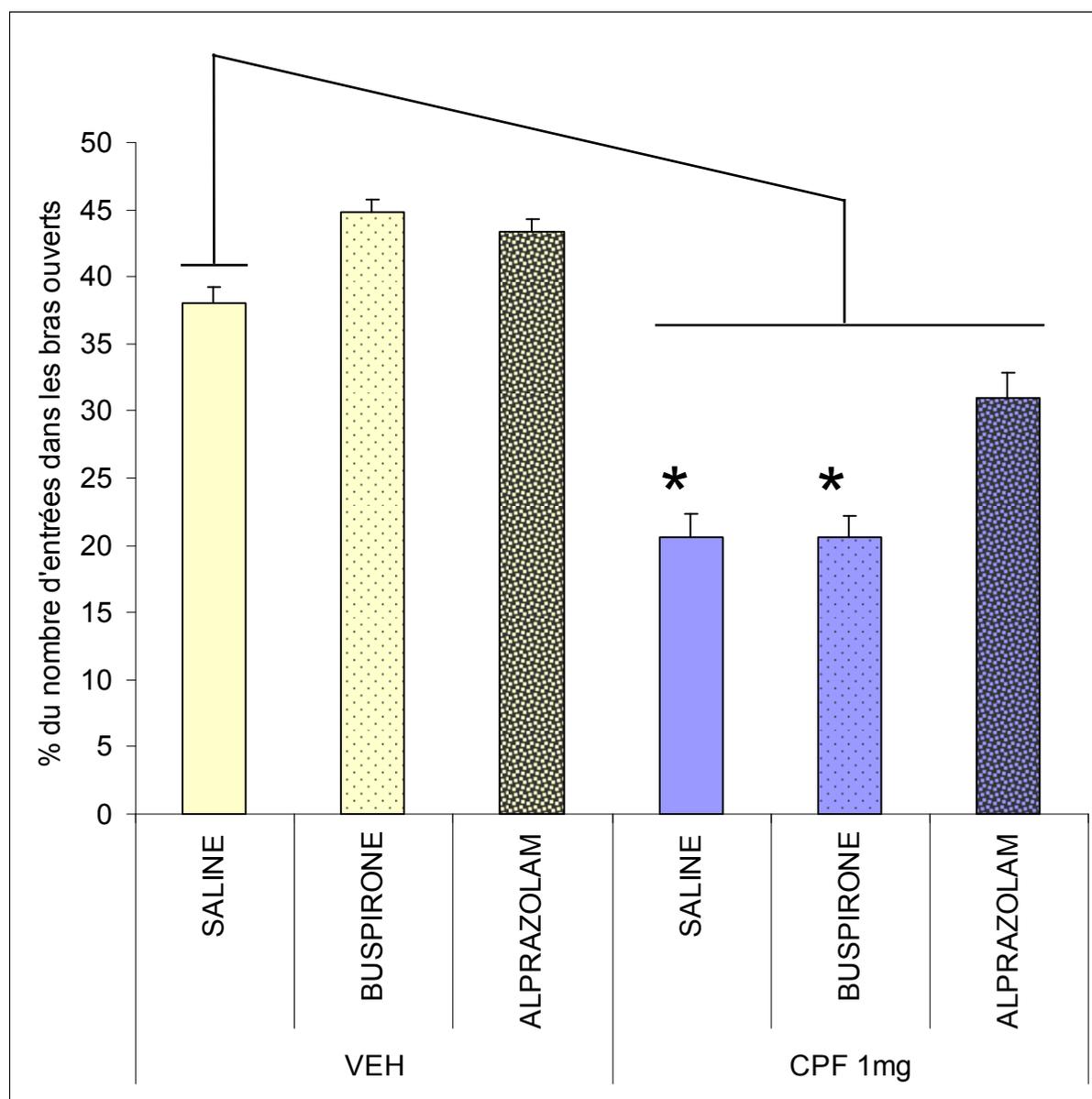


Figure 5.2 : % du nombre d'entrées dans les bras ouverts (moyenne \pm ESM) dans le labyrinthe en croix surélevé des souris CD1 femelles contrôles (VEH) ou exposées au CPF et ayant reçu une solution saline (contrôles) ou un anxiolytique (buspirone et alprazolam). VEH : n=10 par traitement, CPF 1 mg/kg : n=8 par traitement anxiolytique. VEH : n=10 par traitement, CPF 1 mg/kg n=8 par traitement anxiolytique. * : différence significative ($p < 0,05$) versus VEH salin

L'analyse de l'anxiété par les deux critères de mesure (% de temps et % du nombre d'entrées dans les bras ouverts) et l'action anxiolytique produite par l'alprazolam nous permet de conclure que l'exposition à 1 mg/kg de CPF durant la période périnatale (GD 15-PND 14) produit bien une augmentation réelle nette et persistante de l'anxiété chez les souris femelles.

Nous devons constater que l'anxiolytique buspirone, contrairement à l'Alprazolam est inefficace à diminuer le niveau d'anxiété produite par le CPF.

5.5 DISCUSSION

Nous avons confirmé à nouveau qu'une exposition subtoxique chronique périnatale au CPF par gavage de la mère (1 mg/kg.jour) réalisée durant la fin de la gestation et les deux premières semaines de la vie postnatale (GD 15 à PND 14) produit une augmentation significative du niveau d'anxiété chez la souris femelle (CD1) adulte.

L'utilisation de l'alprazolam à 0,2 mg/kg a permis de diminuer le niveau d'anxiété anormalement élevé de ces souris exposées au CPF jusqu'à un niveau proche des souris contrôle dans notre labyrinthe en croix surélevé. Cet agoniste des récepteurs GABAergiques de la famille des benzodiazépines est bien connu pour ses effets anxiolytiques, et en particulier pour diminuer les comportements anxieux chez la souris dans le labyrinthe en croix surélevé : une augmentation du % de temps passé et du nombre d'entrées dans les bras ouverts, pour une dose de 0,1 à 1 mg/kg (Kulkarni and Sharma, 1993; Hata *et al.*, 2001; Carobrez and Bertoglio, 2005).

Les effets anxiolytiques du buspirone, un agoniste des récepteurs 5HT_{1A}, ont été démontrés également chez la souris et dans le labyrinthe en croix surélevé à la dose que nous avons utilisée (10 mg/kg) et même à des doses bien inférieures (Cole and Rodgers, 1994; Hata *et al.*, 2001). Pourtant, le buspirone n'a produit aucun effet anxiolytique sur les souris chez qui le CPF a provoqué de l'anxiété développementale.

L'obtention d'effets anxiolytiques significatifs de l'anxiolytique GABAergique alprazolam confirme que les souris exposées au CPF périnatalement sont bien anxieuses et que d'autre part, leur niveau élevé d'anxiété peut être atténué par la voie GABAergique.

Par contre, l'inefficacité anxiolytique du buspirone pourrait s'expliquer de deux manières. La première serait que le système sérotoninergique ne joue pas de rôle dans l'anxiété provoquée par l'exposition au CPF. Cela nous paraît très peu probable, étant donné le grand nombre de travaux qui démontrent des altérations sérotoninergiques provoquées par le CPF durant le développement (Aldridge *et al.*, 2003; Aldridge *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a; Aldridge *et al.*, 2005b; Aldridge *et al.*, 2005c; Slotkin and Seidler, 2005; Slotkin *et al.*, 2006; Slotkin and Seidler, 2007b; Slotkin and Seidler, 2007c). L'autre explication que nous proposons est que la voie anxiolytique par les récepteurs sérotoninergiques de type 1A (5HT_{1A}) n'est plus fonctionnelle chez ces souris exposées au CPF. Nous suggérons donc que l'exposition subtoxique au CPF durant la fin de la gestation et les deux premières semaines de vie a

produit une altération persistante du nombre ou du fonctionnement des récepteurs 5HT_{1A} qui serait un des mécanismes à l'origine de l'anxiété développementale de ces souris.

Une série d'effets du CPF (ou de mécanismes de subtoxicité du CPF) pourrait être à l'origine du manque de récepteurs 5HT_{1A} dans les zones liées à l'établissement du niveau d'anxiété. En effet, le CPF en doses subtoxiques inhibe la neurogenèse et la migration des neurones durant la fin de la gestation et durant les premières semaines de vie. Il réduit également la poussée des processus axonaux durant la différenciation et par ces effets négatifs sur l'établissement et la conservation des synapses (Whitney *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1998; Das and Barone, 1999; Qiao *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2003). Puisque notre exposition au CPF se déroule de la fin de la gestation jusqu'à la fin de la deuxième semaine et couvre donc une grande partie de la mise en place du système sérotoninergique (chez le rat il débute à GD 18 (Lauder, 1990) et se prolonge trois semaines après la naissance (Kusserow *et al.*, 2004)), ces effets du CPF touchent les neurones sérotoninergiques. Le CPF peut donc provoquer une diminution du nombre de neurones et du nombre de projections axonales sérotoninergiques qui projettent dans les régions responsables de l'établissement du niveau de base de l'anxiété et des comportements anxieux (hippocampe) (Talbot, 2004). En conséquence, par manque de stimulation sérotoninergique pendant les premières semaines du développement durant lesquelles se réalise la mise en place du système sérotoninergique (Kusserow *et al.*, 2004), le nombre de récepteurs sérotoninergiques, en particulier des 5HT_{1A}, serait très fortement réduit dans les régions qui sont normalement riches en récepteur 5HT_{1A} postsynaptiques (Holmes *et al.*, 2003b). Ce manque de récepteurs 5HT_{1A} persistant produirait donc une augmentation du niveau de l'anxiété et l'apparition de comportements anxieux chez l'adulte (Heisler *et al.*, 1998; Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Leonardo and Hen, 2008).

Chez le rat, les effets développementaux du CPF sur le fonctionnement sérotoninergique dans les régions riches en sérotonine (en particulier l'hippocampe) se font à différents niveaux : une altération du nombre de transporteurs sérotoninergiques présynaptiques, une altération du contenu en sérotonine, des changements du turnover de sérotonine et du nombre de récepteurs 5HT_{1A}. Cependant, le sens de ces changements (augmentation ou diminution) dépend du moment de l'exposition [fin de gestation (GD 17-20), premiers jours de vie (PND 1-4), fin de deuxième semaine (PND 11-14)] et également de la concentration de la dose subtoxique de CPF utilisée (1 ou 5 mg/kg). De surcroît, des différences existent dans l'occurrence d'effets et

dans le sens d'altération en fonction du sexe des animaux (Aldridge *et al.*, 2005b; Slotkin and Seidler, 2005; Slotkin and Seidler, 2007b; Slotkin and Seidler, 2007c).

Il est donc difficile de transposer les résultats de ces expériences à la nôtre. En effet, il est impossible de déterminer si l'effet lié à l'exposition d'une période sera dominant par rapport aux autres. De plus, l'étude des effets synergiques du CPF sur ces indices du fonctionnement du système sérotoninergique durant plusieurs de ces périodes sensibles du développement n'a pas été réalisée. Nous ne pouvons donc pas déterminer de manière certaine quel serait l'effet d'une période d'exposition au CPF plus longue et à dose plus basse durant le développement postnatal. Nous retiendrons tout de même que le sens du changement d'activité sérotoninergique, qu'elle provienne de l'altération de la stimulation des récepteurs 5HT_{1A} ou de leur nombre, peut être opposé selon le niveau d'exposition et donc de dose subtoxique utilisée. Cela appuierait notre hypothèse quant à la responsabilité d'une plus faible dose chronique (1 mg/kg et moins) postnatale dans l'obtention d'une augmentation du niveau d'anxiété (chapitres 2, 3 et 4) alors qu'une diminution de l'anxiété est observée chez la souris pour une dose plus élevée (3 mg/kg) (Ricceri *et al.*, 2006).

Nous devons ajouter que les changements du nombre de récepteurs 5HT_{1A} ou les variations d'intensité de leur stimulation n'est pas la seule explication possible à l'occurrence de l'altération de l'anxiété développementale liée à au CPF chez les rongeurs. En effet, le CPF est capable d'altérer des éléments de la cascade de signalisation qui suit l'activation de toute une série de récepteurs synaptiques (Garcia *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2001; Schuh *et al.*, 2002; Yanai *et al.*, 2002), dont l'adénylcyclase qui fait partie d'une des voies de signalisation des récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques (Sibille *et al.*, 2000). Les variations mesurées de libération de sérotonine ou des changements du nombre de récepteurs sérotoninergiques postsynaptiques, que ce soit dans un sens ou l'autre, n'impliquent donc pas nécessairement des changements efficaces de l'activité des récepteurs et ne déterminent pas nécessairement le sens de l'altération des comportements anxieux. Dans notre cas, sachant que la diminution de l'activité des récepteurs 5HT_{1A} provoque une augmentation du niveau d'anxiété (Heisler *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998; Sibille *et al.*, 2000; Klemenhagen *et al.*, 2006), il est possible que l'altération de tout élément de la chaîne de signaux cellulaires qui module la réponse anxiolytique lors de la stimulation de ces récepteurs 5HT_{1A} soit à l'origine de l'anxiété développementale. Plusieurs éléments de la voie sont des candidats possibles, dont l'adénylcyclase (AC) dont nous venons de parler.

Nous devons ajouter que si l'alprazolam peut compenser l'anxiété développée par le CPF, il est logique de penser qu'au moins une partie de la circuiterie de base qui module l'anxiété est encore fonctionnelle chez les souris exposées au CPF, et donc en particulier le système inhibiteur GABAergique. Même si ce système inhibiteur GABAergique est encore fonctionnel, il n'est cependant pas impossible qu'il ne fonctionne pas à un niveau d'activité normal et puisse de cette manière également participer à l'anxiété développementale liée au CPF.

En conclusion, les résultats de nos expériences suggèrent que les récepteurs 5HT_{1A} représenteraient une des cibles des mécanismes de la subtoxicité développementale au CPF qui mène à l'obtention d'une augmentation persistante du niveau d'anxiété chez les souris femelles.

CHAPITRE 6 :
DISCUSSION GÉNÉRALE

6 DISCUSSION GÉNÉRALE.

6.1 EFFETS DÉVELOPPEMENTAUX DU CHLORPYRIFOS ET DE LA PHOSALONE.

6.1.1 ALTÉRATION DE LA MÉMOIRE.

L'exposition subtoxique au CPF ou à la PHO (5 mg/kg) durant le développement du cerveau (GD 15-PND 14) a produit un changement de stratégie d'apprentissage du labyrinthe de Lashley chez les souris mâles (voir chapitre 2). Plus précisément, la rotation de 180° du labyrinthe, qui n'implique qu'une inversion des repères externes lointains, n'a été perçue que par les souris mâles non exposées aux OP (véhicules ; VEH). Ceux-ci étaient donc les seuls à intégrer ces stimuli visuels lointains pour l'établissement (ou acquisition) de la mémoire spatiale nécessaire à la bonne réalisation du parcours du labyrinthe. Ces OP auraient donc perturbé l'intégration des repères externes dans l'établissement de la mémoire spatiale chez la souris mâle. Nous devons souligner que les repères visuels que nous avons utilisés étaient des plus simples : un coté « ouvert » et un coté « mur », ce qui a dû permettre aux souris, malgré leur mauvaise acuité visuelle (Deacon *et al.*, 2002), de prendre en compte des repères externes lointains. Nous avons constaté que les souris femelles, contrairement aux souris mâles ne semblent pas utiliser les critères visuels externes lointains pour mémoriser le chemin du labyrinthe. Les deux OP (CPF ou PHO), en altérant cette intégration des stimuli visuels lointains chez les souris mâles, ont atténué cette différence de stratégie dépendante du sexe.

L'inversion du labyrinthe de Lashley permet d'étudier séparément la mémoire spatiale de travail (qui se rapporte à l'intégration de patrons moteurs qui régissent le sens à prendre à la sortie des T par rapport à l'image du labyrinthe) par l'analyse du nombre d'erreurs de direction prise dans les T, et la mémoire spatiale de référence (qui est la mémorisation de la situation des portes par rapport aux cul-de-sac) par l'examen du nombre d'erreurs d'entrées dans les cul-de-sac (voir chapitre 2.3.3.2). L'inversion du labyrinthe a révélé que la PHO et dans une moindre mesure le CPF affectent la mémoire spatiale de travail des souris femelles et plus faiblement celle des souris mâles. Aussi, puisque les séances du test de Lashley se réalisent à une journée d'intervalle, la mémoire spatiale mise à l'épreuve est donc à long terme.

Le labyrinthe en T nous a aussi permis d'étudier la mémoire spatiale en relation avec l'intégration des stimuli visuels lointains chez les souris mâles (Deacon *et al.*, 2002). Toutefois, contrairement au labyrinthe de Lashley, il n'a mis à l'épreuve que mémoire à court terme car seules quelques secondes séparent deux essais successifs d'alternance. L'étude de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en T transparent (Gerlai, 1998) a révélé une altération de la mémoire spatiale à court terme par le CPF et non par la PHO chez les mâles souris. Le caractère « spontané » de la procédure de l'alternance dans le labyrinthe en T transparent permet la réalisation du test sans renforcement ni motivation alimentaire et donc élimine les possibles modifications comportementales conséquentes au régime alimentaire nécessaire à l'augmentation de la motivation pour l'apprentissage du labyrinthe de Lashley. Aussi, si le CPF était capable de modifier la motivation alimentaire, cette dernière pourrait être un biais que l'utilisation de l'alternance spontanée dans le labyrinthe en T évite.

Par ces deux mesures comportementales de la mémoire, nous concluons que l'exposition subtoxique chronique au CPF durant le développement (GD 15-PND 14) altère la mémoire spatiale liée à l'intégration des repères visuels lointains chez la souris mâle, que cette mémoire soit à long terme ou court terme. Par contre, toujours chez la souris mâle et dans les mêmes conditions d'exposition, la PHO provoquerait une altération de la mémoire spatiale liée à l'intégration des repères visuels lointains mais seulement à long terme.

Chez la souris femelle, l'exposition subtoxique de type long (GD 15-PND 14) à la PHO, et d'une manière moins intense au CPF produirait une altération de la mémoire spatiale de travail à long terme.

Une partie des effets développementaux des OP concernant la mémoire spatiale détectée chez les souris mâles et non chez les souris femelles réside apparemment dans la différence de stratégie qu'utilisent les animaux des deux sexes pour résoudre le labyrinthe. Les souris mâles saines intègreraient plus que les souris femelles les repères (visuels) lointains pour établir leur mémoire spatiale. La supériorité des sujets mâles à se servir des repères externes pour résoudre les labyrinthes spatiaux a déjà été démontrée chez les souris (Stavnezer *et al.*, 2000). Par contre, une autre partie des effets des OP concerne plus amplement la mémoire spatiale à long terme chez les souris de sexe femelle, liée à la mémoire de travail.

Dans la littérature, les études concernant les effets de doses subtoxiques de CPF durant le développement sur la mémoire spatiale des rongeurs se limitent à l'effet de petites périodes

d'exposition de 4 jours, périnatales, et ont été mises en évidence à l'aide d'un labyrinthe radial à 16 bras chez le rat. L'exposition journalière des rats à 1 ou 5 mg/kg de CPF au milieu de la gestation (GD9-12) altère de manière persistante la mémoire spatiale de référence et de travail des rats mâles et femelles (Icenogle *et al.*, 2004). Lorsque la période d'exposition se place un peu plus tard, en fin de gestation (GD 17-20), seules les souris femelles (et non les souris mâles) présentent une altération de la mémoire spatiale de référence et de travail. Dans ce dernier cas d'exposition, le système cholinergique muscarinique semble un des systèmes dont le fonctionnement serait modifié, altéré par le CPF (Levin *et al.*, 2002). Si la période d'exposition au CPF (1 mg/kg) survient encore plus tard, postnatalement, durant les premiers jours de vie (PND 1-4), ce sont les souris mâles uniquement qui présentent des troubles de la mémoire spatiale (Aldridge *et al.*, 2005a). Il est précisé dans cette étude que les capacités cognitives des souris mâles exposées au CPF peuvent s'améliorer par la stimulation des récepteurs sérotoninergiques de type 5HT₂, alors que ce n'est pas le cas chez les souris mâles non exposées. La conclusion proposée par ces auteurs est qu'une altération de l'activité du système sérotoninergique par le CPF serait très probablement responsable de cette modification de la mémoire spatiale chez ces animaux exposés.

Ces derniers résultats obtenus chez le rat que nous venons de décrire, soit une altération de la mémoire spatiale des souris mâles, consécutive à une exposition périnatale (PND 1-4) au CPF, nous rappellent ceux que nous avons obtenus lors de la rotation du labyrinthe de Lashley et qui mettaient en évidence la prise en compte des critères visuels lointains dans la mémoire spatiale des souris mâles (chapitre 2). Par contre, l'altération de la mémoire spatiale de travail et de référence pour une période d'exposition en fin de gestation chez le rat nous semblent se rapprocher de celle que nous avons obtenue lors de l'inversion du labyrinthe chez la souris. Or, la longue période d'exposition au CPF (GD 15-PND 14) que nous avons utilisé couvre les deux périodes et touche les deux sexes.

Donc, le CPF altère la mémoire spatiale des souris de sexe mâle et femelle à des moments différents du développement, et les mécanismes impliqués sont de multiples natures. Il est possible que la prise en compte des repères visuels lointains pour l'établissement de la mémoire spatiale soit aussi touchée chez la souris femelle, mais le labyrinthe de Lashley ne permet pas de le déceler puisqu'il peut être résolu sans tenir compte de ces repères externes (par les souris femelles).

En conclusion, si la littérature a décrit que des petites périodes d'exposition périnatale à des doses subtoxiques de CPF peuvent altérer de manière persistante la mémoire des rongeurs,

parfois des sujets de sexe femelle, parfois des sujets de sexe mâle, en fonction de la période d'exposition, une longue période d'exposition périnatale à des doses plus faibles est également susceptible de produire une diminution des capacités de la mémoire spatiale des souris des deux sexes.

Pour être complet, nous devons signaler qu'un article concernant la modification persistante de la mémoire spatiale des rats, consécutive à une exposition chronique de type long au CPF, vient juste d'être publié (Johnson *et al.*, 2009). Dans cette expérience, une exposition chronique postnatale au CPF (PND 1-20) (par gavage des jeunes dans de l'huile) diminue la performance de la mémoire de travail et de référence du rat mâle et provoque une légère augmentation des performances de la mémoire de référence du rat femelle, chez des animaux âgés de 36 jours. Ces phénomènes ne surviennent que pour l'exposition la plus intense et pas pour les doses les plus basses (1 mg/kg.jour). Il faut préciser que ces doses « élevées » sont adaptées à l'âge des animaux (1,5 mg/kg pour PND 1-5 ; 3,0 mg/kg pour PND 6-13 et 6 mg/kg pour PND 14-20). Dans cette expérience, l'exposition élevée qui donne une modification de la mémoire des rats induit également une inhibition relativement grande de l'activité de l'AChE dans l'hippocampe : 53% d'inhibition au jour PND 20, et celle-ci persiste encore à 23% 10 jours plus tard. Au contraire, l'exposition plus basse (1 mg/kg) qui n'induit pas d'effet, ne provoque pas plus de 14% d'inhibition de l'enzyme dans l'hippocampe au PND 20 et cette inhibition n'est plus significative 10 jours plus tard.

Il est donc logique de penser que l'inhibition de l'AChE postnatale doit participer aux mécanismes qui provoquent ces modifications persistantes de la mémoire spatiale chez le rat dans cette expérience. Dans notre expérience d'exposition longue au CPF, dans laquelle les doses sont beaucoup plus basses (voir chapitre 2), l'inhibition de l'AChE doit participer beaucoup moins à l'obtention des troubles persistants de la mémoire chez la souris. L'intensité de l'occurrence des mécanismes d'inhibition de l'AChE par rapport à celle des mécanismes indépendants à cette inhibition intervient sans doute dans le type d'interférence avec la mémoire spatiale provoqué par le CPF durant le développement postnatal.

La question que nous pourrions nous poser serait :

« Quels sont les mécanismes de toxicité développementale que le CPF met en œuvre pour induire cette altération de la mémoire spatiale à long terme ? »

Pour y répondre, voyons d'abord quelles sont les aires du cerveau et les mécanismes qui régulent la mémoire spatiale. Ensuite, intéressons-nous aux mécanismes de toxicité du CPF qui pourraient être mis en place, ainsi qu'aux cibles du CPF durant le développement qui pourraient être altérées à long terme et modifier la régulation et les performances de mémoire spatiale chez les adultes.

Chez les mammifères, la mémoire spatiale est régulée par des aires associatives du cortex et par l'hippocampe ainsi que par le système du lobe temporal, qui fait le lien entre ces deux structures (Canto *et al.*, 2008). Le lobe temporal représente un axe bidirectionnel qui comprend la région parahippocampale, subdivisée en cortex périrhinal, pararhinal (ou postrhinal) et entorhinal. Ce cortex entorhinal se subdivise lui-même en cortex entorhinal latéral (LEC) et en cortex entorhinal médial (MEC) (Burwell and Amaral, 1998). Les informations visuelles sensibles n'ayant pas de caractère spatial (qui concernent l'identité des stimuli et permettent sa reconnaissance) et provenant d'aires corticales transitent par le cortex périrhinal et projettent ensuite dans l'hippocampe via le LEC. Les informations visuelles sensibles possédant un caractère spatial (impliquées dans les actions motrices guidées par le contexte spatial) provenant de nombreuses aires associatives corticales projettent dans le cortex parahippocampal puis dans le MEC pour finalement aboutir dans l'hippocampe. Les fibres du LEC projettent dans les cellules situées en bordure de la couche CA1 de l'hippocampe et du subiculum alors que les fibres du MEC projettent dans des cellules plus loin de cette limite. Les informations visuelles de nature spatiale et non spatiale transitent donc par des voies différentes. Cependant, certaines fibres du MEC et du LEC terminent également ensemble dans les couches CA1 et CA3 de l'hippocampe, ce qui est le signe de l'intégration des deux types de mémoire à cet endroit (Eichenbaum and Lipton, 2008). L'amygdale est également impliquée dans la modulation des informations spatiales qui seront traitées par l'hippocampe. Cette aire stimule les régions CA1 et CA2 de l'hippocampe lors de la présentation d'un nouvel environnement et stimule également les régions CA4 et le gyrus dentelé de l'hippocampe lorsque le milieu présente des caractéristiques très nouvelles par rapport au milieu habituel. Son inactivation ne permet plus la stimulation de l'hippocampe lors de la découverte d'un nouveau milieu (Sheth *et al.*, 2008). Une altération de cette

structure ou de ses liaisons avec l'hippocampe pourrait participer aux troubles de la mémoire de type spatial produits par le CPF durant le développement du cerveau.

Les mémoires spatiales de travail à court terme (quelques minutes) ou à long terme (au-delà de 3 à 6 heures) font appel à la fois à des régions communes et différentes du cerveau (Vianna *et al.*, 2000). En effet, le cortex préfrontal antérolatéral est crucial pour la mémoire de travail et à long terme, mais pas pour la mémoire à court terme. L'hippocampe (Axmacher *et al.*, 2009), le cortex entorhinal et pariétal sont nécessaires pour ces trois types de mémoire (Izquierdo *et al.*, 1999). L'amygdale n'est pas impliquée dans la mémoire de travail à court terme, mais joue un rôle clé dans la mise en place de la mémoire à long terme en général (Izquierdo *et al.*, 1999). Le cortex parahippocampal a également une fonction dans la mémoire à long terme mais liée à la mémoire de travail uniquement (Axmacher *et al.*, 2008).

Quelles sont donc les aires du cerveau et les mécanismes de régulation qui pourraient être concernés par la toxicité développementale des OP qui mène à une altération persistante de la mémoire spatiale chez les souris ?

Chez les souris mâles, la PHO ne semble pas être impliquée dans les problèmes d'intégration des stimuli spatiaux à court terme (labyrinthe en T) mais bien à long terme (labyrinthe Lashley). La PHO altérerait donc plus vraisemblablement le cortex préfrontal ou le lobe temporal médial mais moins les aires de l'hippocampe qui régissent la mémoire à court terme chez ces animaux. Si l'on considère que la PHO et le CPF altèrent la mémoire spatiale (de travail) à long terme des souris femelles et beaucoup moins ou pas du tout des souris mâles, on peut suggérer que les structures régissant la mémoire de travail à long terme, comme l'hippocampe (CA1 et CA3) et le cortex parahippocampal sont touchées par les OP chez ces souris femelles et beaucoup moins ou pas du tout chez les souris mâles.

Si de nombreux systèmes de neurotransmetteurs (glutamate, acétylcholine, GABA), sont impliqués dans les processus de mémorisation, la sérotonine y joue un rôle modulateur important, en particulier via les récepteurs 5HT_{1A}. Par ces récepteurs, la sérotonine influence les neurones glutamatergiques, cholinergiques et GABAergiques du cortex cérébral, de l'hippocampe et des projections septo-hippocampales qui sont tous impliqués dans la mémoire. Ces récepteurs 5HT_{1A} y régulent la transduction de différents mécanismes tels que les kinases et les gènes précoces (« *immediate early genes* ») impliqués dans la mémoire spatiale à long terme (Ogren *et al.*, 2008).

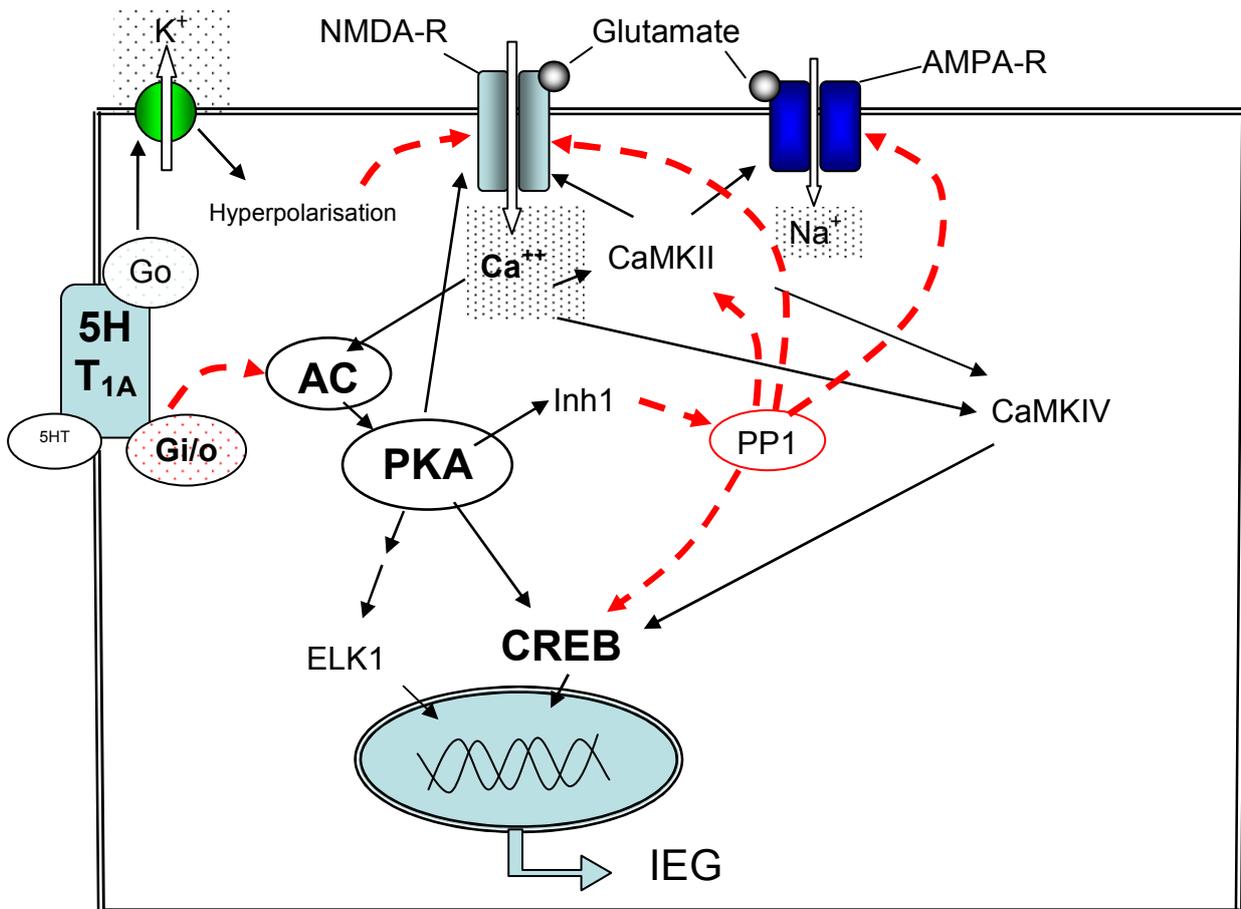


Figure 6.1 . Rôle inhibiteur des récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1A} par son intervention dans la cascade de signaux des récepteurs glutamatergiques hippocampaux menant à la synthèse de nouveaux gènes nécessaires au processus de la mémoire à long terme. Les récepteurs glutamatergiques NMDA activés par le glutamate créent un flux entrant de Ca^{++} qui active la cascade de signaux des kinases via l'adénylcyclase (AC). Cette dernière active la protéine kinase A (PKA), qui joue un rôle central dans l'activation de cette cascade des kinases menant à la phosphorylation du facteur de transcription CREB. Une fois activé, ce facteur produit la synthèse de nouveaux gènes et donc de nouvelles protéines nécessaires à la mémoire à long terme. La PKA activée favorise également le fonctionnement des récepteurs glutamatergiques et stoppe le principal système d'inhibition (PP1) via l'activation de la protéine inh1.

Le rôle inhibiteur des récepteurs 5HT_{1A} sur le fonctionnement de ces neurones activateurs de la mémoire se réalise par l'inhibition de la cascade des kinases, au niveau de l'AC. En effet, l'AC est désactivée par une protéine G inhibitrice (G_{i0}) du complexe 5HT_{1A}, ce qui produit une désactivation du facteur de transcription CREB (et ELK1). (Ogren *et al.*, 2008). (Flèches noire = activation, flèches rouges = inhibition)

Un modèle du rôle inhibiteur des récepteurs 5HT_{1A} a été proposé au niveau des neurones hippocampaux glutamatergiques (Voir figure 6.1) qui sont responsables de la mémoire spatiale. En effet, lorsque les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA de ces neurones hippocampaux sont stimulés par le glutamate, une cascade de signaux cellulaires est activée, jusqu'à l'activation de facteurs de transcription comme le facteur CREB (Roberson *et al.*, 1999). La forme phosphorylée de ce facteur de transcription active la synthèse de nouvelles protéines nécessaires à la formation de la mémoire à long terme (Bozon *et al.*, 2003). En effet, la mémoire à long terme implique la synthèse de protéines nécessaires au développement des neurites et des nouvelles synapses, en particulier dans les neurones de la couche CA1 de l'hippocampe (Rose, 1995; Foley *et al.*, 2003). Dans cette cascade de signalisation cellulaire se trouve l'AC (*adénylcyclase*) qui peut être désactivée (via des protéines G inhibitrices) lors de la stimulation des récepteurs postsynaptiques 5HT_{1A}. Dans ce cas, le facteur de transcription CREB (*cAMP response element binding protein*) est désactivé. La mémoire à long terme est de cette manière inhibée par l'activation des récepteurs 5HT_{1A}.

Nous pouvons ici suggérer un mécanisme par lequel les OP et en particulier le CPF pourraient altérer la mémoire spatiale à long terme. En effet, la cascade de signalisation des récepteurs au glutamate (NMDA et AMPA) de ces neurones hippocampaux, qu'inhibent les récepteurs 5HT_{1A}, comprend donc l'AC, la PKA (protéine kinase A), et le facteur CREB (Ogren *et al.*, 2008). De plus, le fonctionnement de ces trois éléments de la cascade de signalisation impliquée dans les processus de mémorisation AC, PKA et CREB peut être altéré par le CPF (en doses subtoxiques) durant le développement (Huff *et al.*, 1994; Huff and Abou-Donia, 1995; Auman *et al.*, 2000; Schuh *et al.*, 2002; Yanai *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2004).

En général, une stimulation des récepteurs 5HT_{1A} par des agonistes spécifiques provoque une diminution des performances de la mémoire à long terme (qu'elle soit liée ou non à l'hippocampe). On sait également que les antagonistes des récepteurs 5HT_{1A} facilitent la mémoire et l'apprentissage probablement par la levée de l'inhibition des fonctions cholinergiques et glutamatergiques médiées par ce type de récepteurs sérotoninergiques postsynaptiques. Cependant, il existe également des autorécepteurs 5HT_{1A} présynaptiques dont la fonction est d'inhiber la libération de sérotonine et donc de lever la fonction inhibitrice des récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques sur la mémoire. Ses deux systèmes opposés rendent la transmission de l'information par des récepteurs 5HT_{1A} tellement complexe qu'elle peut, en fonction de l'intensité de la stimulation, provoquer autant une facilitation qu'une inhibition de la performance de la mémoire (Ogren *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, plusieurs équipes de chercheurs se sont intéressés aux effets subtoxiques du CPF durant le développement chez le rat et ont montré que cet OP produisait rapidement des modifications de l'activité sérotoninergique, tant dans l'intensité de la stimulation de sérotonine que de l'activité des récepteurs. Par exemple, chez le rat, il a été montré que le traitement au CPF en doses subtoxiques durant le développement peut augmenter à long terme la production de sérotonine et le nombre de récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques, ce qui aurait pour conséquence de diminuer les capacités de mémoire spatiale des animaux à l'âge adulte (Raines *et al.*, 2001; Aldridge *et al.*, 2003; Aldridge *et al.*, 2005b).

D'autres études ont démontré que dans différentes régions du cerveau, l'exposition périnatale au CPF pouvait produire *in vivo*, plus tard dans la vie (45 jours) des perturbations du fonctionnement de la chaîne de signalisation d'inhibition médiée par les récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1A} et de la chaîne d'activation médiée par les récepteurs 5HT₂.

Le sens de l'altération du fonctionnement de ces récepteurs varie en fonction des régions étudiées, du sexe de l'animal, de la période d'exposition et de la dose de CPF (1 et 5 mg/kg). Par exemple, la stimulation sérotoninergique de la région de l'hippocampe d'animaux exposés au CPF durant la période PND 11-14 produit une inhibition plus intense du fonctionnement des neurones hippocampaux par les récepteurs 5HT_{1A}. En d'autres termes, le CPF a augmenté les effets inhibiteurs de 5HT_{1A} dans les neurones hippocampaux (Aldridge *et al.*, 2005c). Cette étude démontre également que le CPF produit à long terme une diminution d'efficacité de l'activité activatrice des récepteurs sérotoninergiques de type 2 (5HT₂-R). Ces perturbations proviendraient de la modification de protéines G qui lient fonctionnellement l'AC aux récepteurs membranaires, mais aussi à l'expression d'isoformes d'AC plus ou moins sensibles et actives (Meyer *et al.*, 2004).

Puisque ces études ne concernent que les effets conséquents à une exposition périnatale de type court au CPF (4 jours), il est difficile de déterminer quel serait l'effet exact final sur l'activité de cette cascade pour une exposition au CPF de type plus long comme celle qui a diminué les capacités de la mémoire spatiale des souris. Retenons de ces expériences que le CPF est capable de produire à long terme une modification persistante de l'activité des éléments de la cascade des kinases en aval des récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques modulant la mémoire spatiale.

Nous ne pouvons pas ignorer que l'altération de la fonction sérotoninergique durant le développement (qui joue un rôle neurotrophique) peut également produire toute une série de

malformations structurelles (Lauder *et al.*, 1985; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1987; Whitaker-Azmitia, 1991; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Azmitia, 2001), qui pourraient mettre en péril directement ou indirectement les circuits de base de la mémoire spatiale qui sera sollicité chez l'adulte. Cependant, des altérations fonctionnelles surviennent à des doses qui ne produisent pas de destructions cellulaires. Il est donc plus probable que de faibles doses de CPF produisent des modifications fonctionnelles par des changements d'activité des récepteurs alors que des doses plus élevées pourraient créer des perturbations du nombre de processus axonaux et synapses entre cellules nerveuses.

Nous pouvons donc conclure que l'exposition périnatale à des doses subtoxiques au CPF, à 1 mg/kg et même plus bas (5 mg/kg via la mère) altère la mémoire spatiale des souris et que plusieurs systèmes de neurotransmetteurs (muscarinique, sérotoninergique, glutamatergiques), paraissent impliqués dans cette altération. Une perturbation du système sérotoninergique, du fonctionnement des récepteurs 5HT_{1A} inhibiteurs et de sa cascade de signaux inhibitrice des neurones hippocampaux dans la mémoire spatiale à long terme pourraient bien représenter des mécanismes de toxicité développementale qui participent à l'altération persistante la mémoire spatiale à long terme développée en conséquence à l'exposition subtoxique au CPF chez la souris femelle.

Les preuves de toxicité développementale du CPF résultant en des troubles persistants de la mémoire, obtenus à l'aide de ces modèles animaux, confirment les soupçons décrits dans les études épidémiologiques quant à la responsabilité du CPF dans le développement de troubles cognitifs chez l'Homme et suggèrent que la PHO pourrait bien présenter un risque développemental pour l'altération de la mémoire chez l'Homme également.

6.1.2 ALTÉRATION DU NIVEAU D'ANXIÉTÉ.

Les résultats issus de l'étude de l'anxiété à l'aide du modèle souris et de plusieurs tests comportementaux nous ont permis de mettre en évidence qu'une exposition subtoxique de longue durée au CPF ou à la PHO durant une bonne partie du développement du cerveau est susceptible de produire une augmentation du niveau d'anxiété chez la souris femelle adulte et non chez la souris mâle (voir chapitre 2). Rappelons que dans cette étude, le moyen d'exposition des jeunes (*in utero* et via le lait) était le traitement des mères durant la fin de la gestation et durant les deux premières semaines de lactation (GD 15-PND 14), avec une dose

de 5 mg/kg journalière. L'utilisation de cette technique d'exposition implique que les jeunes auraient reçu une dose journalière beaucoup plus basse que les 5 mg/kg donnés à la mère (voir chapitre 2 ; (Mattsson *et al.*, 2000)).

Dans la littérature, une exposition périnatale au CPF en doses subtoxiques produit également une modification du niveau d'anxiété chez les souris femelles, et non chez les souris mâles, mais dont le sens de l'effet est opposé (une diminution du niveau d'anxiété) (Ricceri *et al.*, 2006). Nous avons relevé une série de différences dans les protocoles expérimentaux afin de tenter de mettre le doigt sur une explication. Les différences les plus marquantes dans le protocole concernent la dose utilisée et la période d'exposition (le moment et la durée).

Nous avons donc étudié avec notre modèle les variations du niveau d'anxiété en fonction de trois doses croissantes de CPF 0,2 ; 1 et 5 mg/kg.jour. Il est apparu qu'une dose subtoxique journalière d'1 mg/kg de CPF produit une augmentation de l'anxiété plus importante qu'une dose de 5 mg/kg chez les souris femelles (voir chapitre 3) et qu'une dose journalière de 0,2 mg ne produit pratiquement pas d'augmentation persistante du niveau d'anxiété des souris femelles. Ces 5 mg/kg.jour de CPF (*in utero* ou via le lait) ne représentent pas encore un niveau suffisamment haut pour approcher celui d'une exposition directe (par voie sous-cutanée) à 3 mg/kg qui est nécessaire à l'obtention d'une diminution d'anxiété chez les souris femelles.

Cependant, il était peu intéressant de passer à des doses journalières de CPF plus élevées que 5 mg/kg, car elles produiraient des effets toxiques chez la mère, ce qui n'entre pas dans le cadre de notre étude. Nous nous sommes donc intéressés aux effets d'une exposition directe des jeunes au CPF (voir chapitre 4). Pour ce faire, nous avons utilisé des périodes de 4 jours d'exposition subtoxique au CPF, à différents moments du développement postnatal, en utilisant la voie de traitement direct des jeunes (voie sous-cutanée), mais avec une dose journalière de 1 mg/kg, une dose un peu inférieure à celle (« mg/kg) qui a donné lieu à une diminution d'anxiété chez la souris femelle (Ricceri *et al.*, 2006).

Cette exposition courte (4 jours) à 1 mg/kg de CPF a produit une augmentation persistante de l'anxiété chez les souris femelles pour la majorité des périodes postnatales testées (PND 1-4, PND 5-8 et PND 13-16), mais pas pour la période d'exposition située en fin de seconde semaine (PND 9-12). Cette période correspond presque parfaitement à celle qui n'avait pas non plus donné lieu à une modification du niveau d'anxiété avec une dose identique de CPF (1 mg/kg), mais bien une diminution nette du niveau d'anxiété avec dose légèrement plus

élevée (3 mg/kg) (Ricceri *et al.*, 2006). Il semble donc que si certaines périodes du développement périnatal paraissent plus particulièrement sensibles au CPF pour la production de troubles de l'anxiété, la dose jouerait un rôle également dans le sens de cette altération.

Nous suggérons que plusieurs mécanismes différents d'altération du développement du SNC par le CPF, mais survenant en même temps, perturbent le développement du cerveau en produisant des effets opposés en fonction du mécanisme dominant. L'un de ces mécanismes survenant probablement tout au long des trois premières semaines postnatales et à des doses faibles de CPF (1 mg/kg.jour) produirait une augmentation persistante du niveau d'anxiété. L'autre mécanisme donnant lieu à une diminution du niveau d'anxiété ne surviendrait que durant une période critique, longue de quelques jours à la fin de la seconde semaine de vie, et augmenterait en intensité avec la dose de l'insecticide, si bien qu'il débiterait à une dose proche d'1 mg/kg et créerait plus de troubles à 3 mg/kg. De cette manière, durant cette période critique, à une exposition de 1 mg/kg.jour, l'effet persistant anxiolytique produit par le second mécanisme annulerait l'effet anxiogénique produit par le premier mécanisme. Par contre, à une dose journalière de 3 mg/kg de CPF, le deuxième mécanisme serait principalement actif et produirait une diminution de l'anxiété. En dehors de cette période critique et durant les trois premières semaines de vie, seul le premier mécanisme d'altération serait présent et produirait donc à des doses subtoxiques basses (≤ 1 mg/kg.jour) une augmentation persistante de l'anxiété chez la souris femelle. C'est ce dernier phénomène que nous aurions également provoqué lors d'une exposition longue au CPF, à des niveaux d'exposition relativement faibles, par gavage de la mère (5 et 1 mg/kg) (chapitre 2, 3 et 5).

Afin de tenter d'élucider ces mécanismes d'altération du développement produit par le CPF qui seraient responsables de l'augmentation d'anxiété chez la souris femelle, nous nous sommes intéressés au système sérotoninergique, et particulier au récepteurs sérotoninergiques 5HT_{1A}. Ces récepteurs paraissent une cible idéale, car non seulement ils sont impliqués dans les grands mécanismes de régulation du niveau d'anxiété au niveau des neurones des aires impliquées dans cette fonction (en particulier l'hippocampe), mais leur activité est perturbée par des expositions subtoxiques au CPF durant le développement. En effet, les récepteurs 5HT_{1A} représentent une voie d'inhibition de l'activité de neurones régulant l'anxiété, et leur stimulation produit un effet anxiolytique (voir Chapitre 5).

Nous avons pu mettre en relation l'altération du fonctionnement des récepteurs 5HT_{1A} et une augmentation du niveau de l'anxiété chez des souris femelles exposées à 1 mg/kg durant une

longue période périnatale (GD 15-PND 14) et nous avons suggéré qu'un des mécanismes de toxicité développementale du CPF produisant une augmentation d'anxiété serait cette altération du fonctionnement des récepteur 5HT_{1A}.

L'exposition au CPF en doses subtoxiques durant le développement est connue pour altérer le niveau d'activité sérotoninergique (modification de l'expression des transporteurs de sérotonine présynaptiques) qui modifie l'activité des récepteurs 5HT_{1A} dans différentes parties du cerveau, et notamment dans l'hippocampe où ces récepteurs jouent un rôle inhibiteur de l'anxiété. En fonction de la dose et de la période d'exposition au CPF, on peut assister à une augmentation ou une diminution de cette activité de la sérotonine. L'exposition au CPF en doses subtoxiques modifie également l'activité et l'expression de ces récepteurs 5HT_{1A} et le résultat obtenu est une augmentation ou une diminution d'activité sérotoninergique en fonction de la dose et de la période d'exposition. Aussi, le fonctionnement de nombreux éléments de la chaîne de signalisation de ces récepteurs 5HT_{1A}, dont l'AC (Slotkin and Seidler, 2007a), impliqués dans l'effet anxiolytique, est également altéré par le CPF en doses subtoxiques durant le développement du cerveau.

Il est très probable que certains de ces phénomènes soient favorisés en fonction de la dose de CPF appliquée durant le développement et modulent l'anxiété dans un sens ou l'autre.

Une hypothèse pour tenter d'expliquer l'augmentation de l'anxiété que nous avons obtenue chez la souris femelle suite à une exposition postnatale de 1 mg/kg de CPF est que le CPF altérerait de manière persistante l'expression d'éléments de la cascade de signalisation des récepteurs postsynaptiques 5HT_{1A} des cellules de l'hippocampe modulant l'anxiété, ce qui lèverait l'inhibition de l'anxiété, et provoquerait une élévation du niveau d'anxiété chez ces animaux.

La diminution du niveau d'anxiété des souris femelles obtenue par Ricceri et collaborateurs après une exposition au CPF en fin de seconde semaine avec une dose plus élevée (3 mg/kg) pourrait s'expliquer par une augmentation du niveau d'activité de la chaîne de signaux inhibitrice médiée par les récepteurs post synaptique 5HT_{1A}.

Dans ce cas, cette période d'exposition serait un moment du développement où les modifications de l'activité sérotoninergique auraient un impact différent sur le niveau d'anxiété à long terme.

Il est important de se rappeler que c'est durant cette période critique que le système sérotoninergique atteint un pic de stimulation dans la région de l'hippocampe et produit par

effet morphogénique un pic de synaptogenèse et de conservation des synapses. Le niveau de stimulation sérotoninergique durant cette période particulière de plasticité synaptique établit de manière pratiquement définitive le nombre de synapses et niveau d'activité des récepteurs 5HT_{1A}, et autrement dit définit le niveau de base d'anxiété (Leonardo and Hen, 2008). Cette surstimulation sérotoninergique produite par les effets du CPF (3 mg/kg) durant cette période serait suffisante pour favoriser la création et la conservation de synapses par ses effets morphogéniques. Il est donc possible qu'une activité élevée des récepteurs 5HT_{1A} postsynaptiques inhibiteurs soit maintenue, et qu'en réaction, l'activité des cellules de l'hippocampe régissant le taux d'anxiété serait réduite, et produirait un effet anxiolytique persistant.

Ne cachons pas que les récepteurs sérotoninergiques ne sont pas les seuls à être impliqués dans la modulation de l'anxiété et donc que les hypothèses que nous avons formulées ne sont sans doute pas les seules possibilités d'altération du niveau d'anxiété par les OP. Nous pensons par exemple au système GABAergique dont des perturbations du fonctionnement impliquent des troubles de l'anxiété (Mohler, 2006; Domschke and Zwanzger, 2008). Il est possible qu'une perturbation par le CPF du fonctionnement d'éléments de la cascade de signaux de ce récepteur soit à l'origine de troubles de l'anxiété. On sait notamment que l'activité d'un de ces éléments, la protéine kinase C (PKC) est altérée par le CPF (Bagchi *et al.*, 1997; Yanai *et al.*, 2002). De plus, cette PKC jouerait des rôles dans la régulation de ces récepteurs (Song and Messing, 2005). On sait également qu'une forme de protéine kinase C (epsilon) est capable d'augmenter le niveau d'anxiété en diminuant l'inhibition des courants postsynaptiques inhibiteurs dans le cortex préfrontal induits par les récepteurs GABA_A (Van Kolen *et al.*, 2008). Toutes ces informations convergent bien vers une perturbation possible par le CPF de l'activité inhibitrice des récepteurs GABA_A sur l'anxiété.

Une question à laquelle nous n'avons pas encore répondu est : « pourquoi les souris femelles sont touchées par l'anxiété développementale au CPF et à la PHO et pas les souris mâles ? »

Chez l'Homme, la prévalence des troubles de l'humeur (anxiété et dépression) est plus grande chez les sujets de sexe femelle, et serait la conséquence d'au moins des facteurs génétiques (Kornstein, 1997; Grigoriadis and Robinson, 2007; Wilhelm *et al.*, 2008). Cette différence entre le deux sexes quant à l'occurrence de comportements anxieux et dépressifs existe également chez les rongeurs (Palanza, 2001).

Le dimorphisme sexuel fonctionnel et structural du cerveau pourrait donc être à l'origine de cette différence. Une des régions du cerveau particulièrement dimorphique est l'hippocampe, tant au niveau de sa structure que de son fonctionnement. Le taux de base des neurotransmetteurs, incluant la sérotonine n'est pas le même chez les animaux des deux sexes (la concentration de sérotonine dans l'hippocampe est plus élevée chez le rat femelle que chez le rat mâle). Des différences de taille des régions de l'hippocampe existent également, tout comme des différences quant à la sensibilité au stress. En effet, les rongeurs (rats et souris) mâles et femelles réagissent de manière différente au stress, tant au niveau des effets comportementaux produits que des effets cellulaires. Etant donné que c'est bien un stress qui est utilisé dans l'étude de l'anxiété dans les appareils de mesures comme le labyrinthe en croix surélevé ou le « *light and dark box* », il n'est donc pas certain de pouvoir mesurer une modification du niveau d'anxiété de la même intensité chez les deux sexes (Cahill, 2006).

6.1.3 TROUBLES DE LA DÉPRESSION.

Nous avons pu mettre en évidence également qu'une exposition subtoxique au CPF durant une longue période du développement (GD 15-PND 14) était capable de produire des troubles ou signes de dépression chez les souris femelles (voir chapitre 2).

La dépression chez l'adulte est un état global d'hypofonctionnement neural qui produit une détresse et des troubles comportementaux très différents. Les mécanismes qui régissent la dépression sont mal connus. On sait néanmoins que la dépression est liée à une perte à long terme de la fonctionnalité ou parfois à une diminution du nombre de synapses et de neurites dans l'hippocampe (CA3 surtout) (Stockmeier *et al.*, 2004) et dans le cortex préfrontal médial (diminution du nombre de dendrites des cellules pyramidales) (Cook and Wellman, 2004; Radley *et al.*, 2004). L'occurrence de cette maladie trouve probablement son origine dans la perturbation de la plasticité synaptique des neurones hippocampaux qui joue un rôle dans la mémoire à long terme également (Pittenger and Duman, 2008). Une augmentation des connections synaptiques entre l'amygdale et l'hippocampe survient également lors de l'occurrence de dépression chez le rat (Vyas *et al.*, 2002; Vyas *et al.*, 2003).

Comment le CPF pourrait-il donc induire de la dépression ?

Puisque le CPF est capable d'inhiber la croissance des neurites et la synaptogenèse, il est sans doute à l'origine d'une perturbation du réseau fonctionnel entre l'hippocampe, le cortex préfrontal médial et l'amygdale, qui a mené à cet état de dépression chez les souris femelles.

Une deuxième piste est que le CPF pourrait avoir perturbé la cascade de signalisation des neurones hippocampaux qui régule la plasticité synaptique. En effet, le CPF a pu modifier l'expression d'éléments de la cascade de signaux cellulaires postsynaptiques participant à la régulation de la plasticité synaptique qui détermine la conservation des synapses. Nous pensons en particulier à l'AC, la PKA (protéine kinase A) et CREB (Pittenger and Duman, 2008), dont l'expression est altérée par une exposition à des doses subtoxiques de CPF (Slotkin and Seidler, 2007a).

La dépression trouve de nombreux points communs avec une forme d'anxiété nommée l'anxiété généralisée. En effet, l'occurrence de ces troubles de l'humeur, notamment face à un stress, sont associés à une perturbation du système sérotoninergique (et dopaminergique) dans laquelle les récepteurs sérotoninergiques de type 5HT_{1A} des neurones hippocampaux joueraient un rôle crucial. La mise en place de ce système se fait durant les premières semaines de vie chez les rongeurs, périodes durant lesquelles l'exposition au CPF produirait de la dépression chez les souris (Leonardo and Hen, 2008).

Nous suggérons donc que le CPF aurait pu produire cette forme de dépression par une altération du fonctionnement sérotoninergique 5HT_{1A} au niveau des neurones hippocampaux.

6.1.4 TROUBLES DE L'ACTIVITÉ LOCOMOTRICE SPONTANÉE.

Une exposition de type long (GD 15-PND 14), à des doses subtoxiques relativement faibles (5 mg/kg via la mère) de CPF ou de PHO produit une hypoactivité persistante chez les souris mâles (chapitre 2), avec un effet plus prononcé pour la PHO. Cette hypoactivité survient également chez les souris mâles pour une exposition postnatale à 1 mg/kg de CPF par voie sous-cutanée (chapitre 4).

La littérature nous offre une série d'effets d'altération de l'activité du rat, chez qui la femelle ou le mâle est concerné en fonction de la période d'exposition. En effet, l'exposition au CPF durant le milieu de gestation produit une hypoactivité et une altération de l'habituation des rats mâles et femelles (GD9-12) (Icenogle *et al.*, 2004) alors que seules les souris femelles présentent une altération de l'habituation lorsque l'exposition se trouve en fin de gestation (GD 17-20) (Levin *et al.*, 2002), et que seuls les rats mâles montrent une hypoactivité lorsque la période d'exposition au CPF se déroule en début de vie (PND 1-4). Par contre, quelque soit la dose subtoxique de CPF, (1 ou 5 mg/kg), les rats ne présentent plus de signes d'altération

de l'activité locomotrice ou d'habitation pour une période d'exposition plus tardive (Dam *et al.*, 2000). Chez la souris, une hyperactivité est décelée uniquement pour une période de fin de gestation (GD 15-18), et uniquement pour une dose de 6 mg/kg (sans donner de résultats avec 3 mg/kg) (Ricceri *et al.*, 2006). Il existerait donc une période de sensibilité à l'altération de l'activité durant le milieu de la gestation pour les souris des deux sexes, suivie par une période de sensibilité pour les souris femelles en fin de gestation et enfin une période sensible pour les nouveau-nés mâles.

Une des causes connues des altérations de l'activité est la perturbation des phases de prolifération des cellules nerveuses du cervelet. La première phase de prolifération concerne les cellules de Purkinje, qui se forment en milieu de gestation alors que les autres cellules du cervelet ne prolifèrent que plus tard, après la naissance. L'utilisation d'un perturbateur de la prolifération durant cette période produit une hyperactivité, alors que l'utilisation du même perturbateur avant ou après cette phase produit de l'hypoactivité (Rodier, 1986). Etant donné les capacités d'inhibition de la prolifération par le CPF, il n'est donc pas surprenant d'obtenir une perturbation de l'activité telle qu'une hypoactivité pour les périodes d'exposition suivant le milieu de la gestation. Le dimorphisme sexuel impliquerait que le développement du cervelet de la souris mâle surviendrait plus tardivement que celui de la souris femelle, et qu'il serait de ce fait plus amplement touché par le CPF durant la période périnatale.

Nos résultats d'exposition au CPF durant l'adolescence appuieraient une période critique pour l'altération de l'activité chez les rongeurs, qui serait la conséquence d'une altération de la poussée axonale et de la synaptogenèse au niveau du cervelet.

La modification de l'activité des souris pourrait également trouver son origine dans une altération du système sérotoninergique dont l'activité serait en relation avec celle de la locomotion (Loizou, 1972; Leonardo and Hen, 2008).

6.2 IMPLICATIONS CHEZ L'HOMME : ÉTABLISSEMENT DU NIVEAU D'EXPOSITION DE SUBTOXICITÉ DÉVELOPPEMENTALE.

Les grandes similitudes des mécanismes du développement du cerveau chez les mammifères, et en particulier entre les rongeurs et l'Homme, permettent aux données concernant les effets développementaux et issues des modèles animaux de représenter des informations intéressantes pour élaborer une mesure du risque de toxicité développementale au CPF chez

l'Homme. Cependant, le niveau d'exposition à partir duquel le CPF devient subtoxique chez l'Homme reste à établir.

Par une série d'études épidémiologiques bien ciblées, on peut imaginer qu'il serait possible de déterminer ce niveau minimum d'exposition au CPF à partir duquel l'Homme en développement serait sensible à la toxicité développementale de cet insecticide. Dans ce cas, le risque pourrait être sous estimé pour plusieurs raisons.

La première raison est la sensibilité individuelle aux inhibiteurs des cholinestérases. En effet, une étude clinique a démontré qu'une partie de la population est particulièrement plus sensible aux inhibiteurs des cholinestérases. En effet, la BuChE qui est une cible pour les inhibiteurs des cholinestérases (dont les OP et le CPF), jouerait en conséquence un rôle de protection du cerveau en limitant la quantité d'inhibiteur qui peut arriver jusqu'à l'AChE synaptique. Or, chez l'Homme, il s'avère qu'une fraction de la population produit une variante à la BuChE : la (D70G)-BuChE beaucoup moins « active » vis-à-vis des anti-cholinestérases dont font partie les OP. En conséquence, cette fraction non négligeable de la population humaine (24%), est beaucoup plus sensible aux OP (Lockridge and Masson, 2000). Il existe également une partie de la population montrant une faible activité en PON1, l'enzyme nécessaire à la métabolisation du CPO (la forme active du CPF). Cette faible activité serait donc une source de sensibilité supplémentaire à la neurotoxicité développementale au CPF (Berkowitz *et al.*, 2004).

Une seconde raison est la possibilité d'effets synergiques avec d'autres perturbateurs développementaux également présents dans l'environnement. Si notre modèle souris a permis de mettre en évidence un certain nombre d'altérations comportementales liées à la toxicité développementale du CPF (et de la PHO) en doses subtoxiques, il faut souligner que les manipulations sont réalisées dans des conditions de laboratoire, et donc à l'abri d'autres substances neurotoxiques. Ce n'est pas le cas de l'Homme, qui est susceptible d'être exposé à toute une série de substances neurotoxiques (Costa *et al.*, 2004) et dont les effets développementaux pourraient d'associer à ceux du CPF.

Nous pensons en particulier aux effets développementaux de la nicotine (agoniste cholinergique nicotinique) dont les effets sont similaires à une partie de ceux du CPF, tels que l'altération de la prolifération, de la différenciation et de la synaptogenèse (Slotkin, 1999; Slotkin, 2004) mais également aux autres OP qui sont capables de produire des altérations semblables. Par exemple le diazinon qui peut produire également des altérations des facteurs de transcription (Slotkin *et al.*, 2007a; Slotkin and Seidler, 2007a; Slotkin and Seidler, 2008a),

et donc d'induire des troubles similaires à ceux du CPF. Des troubles cognitifs ont d'ailleurs été mis en évidence pour une exposition subtoxique (PND 1-4) à cet insecticide (Timofeeva *et al.*, 2008a). Des effets comportementaux persistants, conséquents à une exposition subtoxique au parathion, un autre insecticide OP, ont été mis en évidence chez le rat pour une exposition en début de vie également (Timofeeva *et al.*, 2008b).

Dans ce cadre d'interférence entre les OP et la nicotine, il a été montré que des souris exposées périnatalement à la nicotine sont plus sensibles au paraoxon (Ankarberg *et al.*, 2004).

Une troisième raison est la plus grande complexité de certaines régions du cerveau chez l'Homme ainsi que de certains comportements. En effet, si le développement du cerveau est relativement semblable entre l'Homme et les rongeurs qui nous ont servi de modèle d'étude, il existe une différence dans la complexité finale du système. En particulier la formation et le développement de l'hippocampe et du néocortex cérébral débutent d'une manière similaire chez l'Homme et chez les rongeurs mais le développement de ces structures atteint une complexité plus grande chez l'Homme, chez qui elles assurent des fonctions cognitives et sociales plus complexes (Rodier, 1980; Rodier, 1995; Rice and Barone, 2000).

6.3 CONCLUSION.

L'exposition subtoxique au CPF et à la PHO durant le développement du cerveau peuvent produire des altérations de la mémoire spatiale chez la souris de sexe mâle et femelle, ainsi qu'une augmentation du niveau d'anxiété et de la dépression chez la souris femelle.

Parmi les possibles mécanismes d'altération du développement produits par le CPF et qui mèneraient à ces troubles développementaux, nous en suggérons au moins un qui serait commun à produire ces différents troubles : une modification du fonctionnement du système sérotoninergique, en particulier via les 5HT_{1A}. Au vu de la complexité des rôles régulateurs liés à ces récepteurs dans le complexe hippocampal, et des nombreux effets possibles du CPF en amont et en aval de ces récepteurs, tant dans des modifications de l'activité sérotoninergique que de l'expression de ces récepteurs, mais également dans la cascade de signalisation postsynaptique, de plus amples études devront être réalisées pour comprendre quelles sont parmi ces altérations celles qui produisent de tels troubles comportementaux persistants chez l'adulte. Il semble que ces différents mécanismes de toxicité développementale peuvent être mis à contribution de manière différente en fonction de la dose d'exposition subtoxique, en particulier dans l'altération du niveau d'anxiété.

Une étude récente a montré également que l'exposition périnatale subtoxique au CPF en milieu de gestation était capable d'induire également des altérations du fonctionnement de la thyroïde et de la glande adrénargique chez la souris, sans autre signe apparent de toxicité. Ces effets augmenteraient avec la dose prénatale ($6 > 3$ mg/kg) ou postnatale (PND 11-14 ; $3 > 1$ mg/kg) et ne seraient plus présents que chez la souris mâle pour une exposition postnatale (De Angelis *et al.*, 2009). Etant donné le rôle important que jouent les hormones thyroïdiennes dans la régulation du développement du cerveau chez les mammifères (croissance et maturation) et dans son fonctionnement chez l'adulte (Bernal *et al.*, 2003), les modifications d'activité de ces hormones participent sans doute à l'occurrence des troubles comportementaux produits par le CPF, et pourraient expliquer une partie des troubles provoqués par une exposition postnatale uniquement chez les sujets mâles. Il faudra cependant vérifier que les perturbations endocriniennes sont bien en relation avec les troubles comportementaux chez la souris pour en tirer des conclusions.

Certains des troubles persistants détectés chez la souris, comme une altération de la mémoire par l'exposition prénatale à des doses subtoxiques de CPF confirmeraient ceux détectés par certaines études épidémiologiques chez l'Homme. D'autres troubles persistants comme l'anxiété et la dépression chez les souris représenteraient des arguments supplémentaires pour prolonger les études épidémiologiques réalisées chez l'enfant afin de vérifier si ce phénomène survient chez l'Homme adulte.

Les effets développementaux de la PHO en doses subtoxiques chroniques, mis en évidence par notre modèle souris, fournissent la première preuve de toxicité développementale de ce produit. Etant donné la similitude entre la plupart des effets comportementaux persistants produits par cet insecticide sur le modèle animal et ceux produits par le CPF, l'exposition de l'Homme à la PHO pourrait représenter un risque tout aussi préoccupant que celui qu'engendrerait une exposition au CPF.

D'autres études réalisées avec le diazinon et le parathion ont montré que ces autres OP, même en doses subtoxiques sont également susceptibles de produire des altérations du fonctionnement des facteurs neurotrophiques, de leurs récepteurs et de la cascade de signalisation qui contrôlent la différenciation cellulaire et la formation des circuits nerveux (Jameson *et al.*, 2007; Slotkin *et al.*, 2007a; Slotkin *et al.*, 2007b; Slotkin *et al.*, 2008d; Slotkin *et al.*, 2008e). Le parathion (Slotkin *et al.*, 2006; Slotkin *et al.*, 2008b; Slotkin *et al.*,

2009), le méthyle-parathion (Ruckart *et al.*, 2004) et le diazinon (Slotkin *et al.*, 2006; Slotkin *et al.*, 2008c; Slotkin and Seidler, 2008c) produisent en particulier, tout comme le CPF des altérations persistantes du système sérotoninergique. Ces autres OP paraissent pouvoir produire des troubles comportementaux persistants, non identiques, à condition que la période d'exposition se déroule durant la période périnatale, et ceci à des doses subtoxiques (Roegge *et al.*, 2008; Slotkin *et al.*, 2008a; Timofeeva *et al.*, 2008b). Dans le même cadre d'études d'effets subtoxiques produits durant le développement, le dichlorvos crée des troubles comportementaux, dont au moins des déficits de la mémoire chez le rat, et de nouveau par des mécanismes touchant la cascade de signalisation de récepteurs muscariniques et le facteur de transcription CREB (Verma *et al.*, 2009).

Une étude récente suggère qu'il est bien probable que les OP puissent être également des perturbateurs endocriniens, comme cela a été démontré récemment (De Angelis *et al.*, 2009).

Nous devons donc constater qu'au fur et à mesure que sont étudiés les OP, s'allonge la liste des insecticides (CPF, diazinon, parathion, méthyle-parathion, dichlorvos, phosalone ...) capables de produire des altérations comportementales persistantes par une perturbation du développement du cerveau chez les mammifères. Au vu de l'utilisation à grande échelle de ces insecticides, ne faudrait-il pas penser, plutôt que de produire des variantes ayant le même principe actif, à renoncer à ce principe insecticide et de chercher de nouvelles voies insecticides, si l'on veut éviter le risque de produire des troubles comportementaux chez les mammifères et l'Homme ?

Dans un cadre plus large, comme l'on suggéré d'autres chercheurs (Grandjean and Landrigan, 2006), il est même logique de penser que toute substance neurotoxique, qui cible le fonctionnement des neurotransmetteurs du cerveau chez l'adulte, est susceptible de produire des effets développementaux, puisque tous les neurotransmetteurs sont impliqués dans la régulation du développement de cet organe.

Remplacer des insecticides neurotoxiques par d'autres n'est sans doute pas la bonne voie à suivre si l'on veut éviter ces problèmes développementaux.

7 PERSPECTIVES.

La troisième semaine postnatale apparaît comme un moment particulier du développement du système sérotoninergique et pour l'occurrence de l'anxiété développementale liée à l'exposition subtoxique aux OP. En effet, nous avons vu que le sens de l'altération semble varier en fonction de la dose chronique appliquée. Il serait donc intéressant de le vérifier au sein d'une même expérience, en utilisant différentes doses subtoxiques durant cette période critique tardive.

L'exposition par voie orale de la mère assure un type particulier d'exposition qui s'avère produire des effets développementaux différents de ceux produits par voie sous-cutanée directe. Cependant, la manipulation lors du traitement des jeunes ou de la mère au CPF avant le sevrage des jeunes pourrait produire de l'anxiété chez ces animaux, ce qui biaiserait les résultats des études d'anxiété développementale chez les rongeurs. L'exposition à de très faibles doses d'OP via l'eau de boisson fournirait un moyen d'étudier les effets développementaux sans manipuler les animaux.

8 BIBLIOGRAPHIE.

- Achenbach TM.(1991). Manual for the Child Behavior Checklist/4-18 and 1991 Profile. Burlington: University of Vermont Department of Psychiatry.
- Adinolfi, M. (1985). The development of the human blood-CSF-brain barrier. *Dev Med Child Neurol* **27**, 532-537.
- Aiuto, L. A., Pavlakis, S. G., and Boxer, R. A. (1993). Life-threatening organophosphate-induced delayed polyneuropathy in a child after accidental chlorpyrifos ingestion. In *J Pediatr*, pp. 658-660.
- Albert, P. R., and Lemonde, S. (2004). 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist* **10**, 575-593.
- Albert, P. R., Zhou, Q. Y., Van Tol, H. H., Bunzow, J. R., and Civelli, O. (1990). Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine1A receptor gene. *J Biol Chem* **265**, 5825-5832.
- Aldridge, J. E., Levin, E. D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2005a). Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ Health Perspect* **113**, 527-531.
- Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2005b). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ Health Perspect* **113**, 1027-1031.
- Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2005c). Developmental exposure to terbutaline and chlorpyrifos: pharmacotherapy of preterm labor and an environmental neurotoxicant converge on serotonergic systems in neonatal rat brain regions. *Toxicol Appl Pharmacol* **203**, 132-144.
- Aldridge, J. E., Seidler, F. J., Meyer, A., Thillai, I., and Slotkin, T. A. (2003). Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods. *Environ Health Perspect* **111**, 1736-1743.
- Aldridge, J. E., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2004). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environ Health Perspect* **112**, 148-155.
- Alfano, D. P., and Petit, T. L. (1982). Neonatal lead exposure alters the dendritic development of hippocampal dentate granule cells. *Exp Neurol* **75**, 275-288.
- Andersen, H. R., Nielsen, J. B., and Grandjean, P. (2000). Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology* **144**, 121-127.
- Ankarberg, E., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (2004). Increased susceptibility to adult paraoxon exposure in mice neonatally exposed to nicotine. *Toxicol Sci* **82**, 555-561.
- Arvat, E., Giordano, R., Grottoli, S., and Ghigo, E. (2002). Benzodiazepines and anterior pituitary function. *J Endocrinol Invest* **25**, 735-747.
- Atack, J. R. (2003). Anxiolytic compounds acting at the GABA(A) receptor benzodiazepine binding site. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **2**, 213-232.
- Audesirk, T., and Cabell, L. (1999). Nanomolar concentrations of nicotine and cotinine alter the development of cultured hippocampal neurons via non-acetylcholine receptor-mediated mechanisms. *Neurotoxicology* **20**, 639-646.
- Auger, C. J., and Forbes-Lorman, R. M. (2008). Progesterone receptor-mediated reduction of anxiety-like behavior in male rats. *PLoS ONE* **3**, e3606.

- Augustinsson, K. B., and Barr, M. (1963). Age Variation in Plasma Arylesterase Activity in Children. *Clin Chim Acta* **8**, 568-573.
- Augustsson, H., Dahlborn, K., and Meyerson, B. J. (2005). Exploration and risk assessment in female wild house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiol Behav* **84**, 265-277.
- Auman, J. T., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2000). Neonatal chlorpyrifos exposure targets multiple proteins governing the hepatic adenylyl cyclase signaling cascade: implications for neurotoxicity. *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 19-27.
- Axmacher, N., Elger, C. E., and Fell, J. (2009). Working memory-related hippocampal deactivation interferes with long-term memory formation. *J Neurosci* **29**, 1052-1060.
- Axmacher, N., Schmitz, D. P., Weinreich, I., Elger, C. E., and Fell, J. (2008). Interaction of working memory and long-term memory in the medial temporal lobe. *Cereb Cortex* **18**, 2868-2878.
- Azmitia, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* **56**, 413-424.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Tang, L., and Stohs, S. J. (1997). Comparative in vitro and in vivo protein kinase C activation by selected pesticides and transition metal salts. *Toxicol Lett* **91**, 31-37.
- Bakke, J. E., and Price, C. E. (1976). Metabolism of O,O-dimethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate in sheep and rats and of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in sheep. *J Environ Sci Health B* **11**, 9-22.
- Balali-Mood, M., and Balali-Mood, K. (2008). Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Arch Iran Med* **11**, 65-89.
- Bale, T. L., Davis, A. M., Auger, A. P., Dorsa, D. M., and McCarthy, M. M. (2001). CNS region-specific oxytocin receptor expression: importance in regulation of anxiety and sex behavior. *J Neurosci* **21**, 2546-2552.
- Barone, S., Jr., Das, K. P., Lassiter, T. L., and White, L. D. (2000). Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. *Neurotoxicology* **21**, 15-36.
- Barone, S., Jr., Haykal-Coates, N., Parran, D. K., and Tilson, H. A. (1998). Gestational exposure to methylmercury alters the developmental pattern of trk-like immunoreactivity in the rat brain and results in cortical dysmorphology. *Brain Res Dev Brain Res* **109**, 13-31.
- Barr, D. B., and Angerer, J. (2006). Potential uses of biomonitoring data: a case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malathion. *Environ Health Perspect* **114**, 1763-1769.
- Bayer, S. A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* **190**, 115-134.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., Dai, X. F., and Simmons, J. A. (1991). Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J Comp Neurol* **307**, 499-516.
- 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**, 83-144.
- Bedi, K. S., Thomas, Y. M., Davies, C. A., and Dobbing, J. (1980). Synapse-to-neuron ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30-day-old and adult rats undernourished during early postnatal life. *J Comp Neurol* **193**, 49-56.
- Behar, T. N., Li, Y. X., Tran, H. T., Ma, W., Dunlap, V., Scott, C., and Barker, J. L. (1996). GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* **16**, 1808-1818.

- Behar, T. N., Schaffner, A. E., Scott, C. A., Greene, C. L., and Barker, J. L. (2000). GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* **10**, 899-909.
- Behar, T. N., Scott, C. A., Greene, C. L., Wen, X., Smith, S. V., Maric, D., Liu, Q. Y., Colton, C. A., and Barker, J. L. (1999). Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* **19**, 4449-4461.
- Belzung, C. (2001). Rodent models of anxiety-like behaviors: are they predictive for compounds acting via non-benzodiazepine mechanisms? *Curr Opin Investig Drugs* **2**, 1108-1111.
- Berkowitz, G. S., Wetmur, J. G., Birman-Deych, E., Obel, J., Lapinski, R. H., Godbold, J. H., Holzman, I. R., and Wolff, M. S. (2004). In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ Health Perspect* **112**, 388-391.
- Bernal, J., Guadano-Ferraz, A., and Morte, B. (2003). Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid* **13**, 1005-1012.
- Bigbee, J. W., Sharma, K. V., Gupta, J. J., and Dupree, J. L. (1999). Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 1**, 81-87.
- Bjorling-Poulsen, M., Andersen, H. R., and Grandjean, P. (2008). Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health* **7**, 50.
- Black, I. B. (1982). Stages of Neurotransmitter Development in Autonomic Neurons. *Science* **215**, 1198-1204.
- Blaschke, A. J., Staley, K., and Chun, J. (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* **122**, 1165-1174.
- 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. *J Comp Neurol* **396**, 39-50.
- Blier, P., de Montigny, C., and Chaput, Y. (1988). Electrophysiological assessment of the effects of antidepressant treatments on the efficacy of 5-HT neurotransmission. *Clin Neuropharmacol* **11 Suppl 2**, S1-10.
- Boehm, G. W., Sherman, G. F., Rosen, G. D., Galaburda, A. M., and Denenberg, V. H. (1996). Neocortical ectopias in BXSB mice: effects upon reference and working memory systems. *Cereb Cortex* **6**, 696-700.
- Bomser, J. A., Quistad, G. B., and Casida, J. E. (2002). Chlorpyrifos oxon potentiates diacylglycerol-induced extracellular signal-regulated kinase (ERK 44/42) activation, possibly by diacylglycerol lipase inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol* **178**, 29-36.
- Bonde, J. P., Toft, G., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Giwercman, A., Spano, M., Manicardi, G. C., Bizzaro, D., Ludwicki, J. K., Zvezday, V., Bonefeld-Jorgensen, E. C., Pedersen, H. S., Jonsson, B. A., and Thulstrup, A. M. (2008). Fertility and markers of male reproductive function in Inuit and European populations spanning large contrasts in blood levels of persistent organochlorines. *Environ Health Perspect* **116**, 269-277.
- Bourgeois, J. P. (2005). [Brain synaptogenesis and epigenesis]. *Med Sci (Paris)* **21**, 428-433.
- Bourgeois, J. P., Goldman-Rakic, P. S., and Rakic, P. (1994). Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. *Cereb Cortex* **4**, 78-96.
- Bourin, M., and Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* **463**, 55-65.
- Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S. A., Silva, A. J., Davis, S., and Laroche, S. (2003). MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 805-814.

- Branchi, I., Capone, F., Vitalone, A., Madia, F., Santucci, D., Alleva, E., and Costa, L. G. (2005). Early developmental exposure to BDE 99 or Aroclor 1254 affects neurobehavioural profile: interference from the administration route. *Neurotoxicology* **26**, 183-192.
- Brimijoin, S., and Hammond, P. (1996). Transient expression of acetylcholinesterase messenger RNA and enzyme activity in developing rat thalamus studied by quantitative histochemistry and in situ hybridization. *Neuroscience* **71**, 555-565.
- Brimijoin, S., and Koenigsberger, C. (1999). Cholinesterases in neural development: new findings and toxicologic implications. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 1**, 59-64.
- Burwell, R. D., and Amaral, D. G. (1998). Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* **398**, 179-205.
- Cahill, L. (2006). Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* **7**, 477-484.
- Cameron, H. A., Hazel, T. G., and McKay, R. D. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J Neurobiol* **36**, 287-306.
- Campbell, A. (2008). Attachment, aggression and affiliation: the role of oxytocin in female social behavior. *Biol Psychol* **77**, 1-10.
- Campbell, C. G., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1997). Chlorpyrifos interferes with cell development in rat brain regions. *Brain Res Bull* **43**, 179-189.
- Canto, C. B., Wouterlood, F. G., and Witter, M. P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* **2008**, 381243.
- Carobrez, A. P., and Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* **29**, 1193-1205.
- Carr, R. L., and Nail, C. A. (2008). Effect of different administration paradigms on cholinesterase inhibition following repeated chlorpyrifos exposure in late preweanling rats. *Toxicol Sci* **106**, 186-192.
- Chalmers, D. T., and Watson, S. J. (1991). Comparative anatomical distribution of 5-HT1A receptor mRNA and 5-HT1A binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res* **561**, 51-60.
- Choi, B. H. (1989). The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* **32**, 447-470.
- Choleris, E., Little, S. R., Mong, J. A., Puram, S. V., Langer, R., and Pfaff, D. W. (2007). Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4670-4675.
- Clegg, D. J., and van Gemert, M. (1999). Determination of the reference dose for chlorpyrifos: proceedings of an expert panel. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **2**, 211-255.
- Colborn, T. (2006). A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. *Environ Health Perspect* **114**, 10-17.
- Cole, J. C., and Rodgers, R. J. (1994). Ethological evaluation of the effects of acute and chronic buspirone treatment in the murine elevated plus-maze test: comparison with haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* **114**, 288-296.
- Cook, S. C., and Wellman, C. L. (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* **60**, 236-248.
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* **366**, 1-13.
- Costa, L. G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., and Soldin, O. P. (2004). Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 87-110.

- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., and Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci* **13**, 1240-1249.
- Crumpton, T. L., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2000). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. *Brain Res* **857**, 87-98.
- Cuadros, M. A., and Navascues, J. (1998). The origin and differentiation of microglial cells during development. *Prog Neurobiol* **56**, 173-189.
- Cutler, A. R., Wilkerson, A. E., Gingras, J. L., and Levin, E. D. (1996). Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development at birth. *Neurotoxicol Teratol* **18**, 635-643.
- Dam, K., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1999). Chlorpyrifos releases norepinephrine from adult and neonatal rat brain synaptosomes. *Brain Res Dev Brain Res* **118**, 129-133.
- Dam, K., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res Dev Brain Res* **121**, 179-187.
- Dam, K., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2003). Transcriptional biomarkers distinguish between vulnerable periods for developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Implications for toxicogenomics. *Brain Res Bull* **59**, 261-265.
- Das, K. P., and Barone, S., Jr. (1999). Neuronal differentiation in PC12 cells is inhibited by chlorpyrifos and its metabolites: is acetylcholinesterase inhibition the site of action? *Toxicol Appl Pharmacol* **160**, 217-230.
- De Angelis, S., Tassinari, R., Maranghi, F., Eusepi, A., Di Virgilio, A., Chiarotti, F., Ricceri, L., Venerosi Pesciolini, A., Gilardi, E., Moracci, G., Calamandrei, G., Olivieri, A., and Mantovani, A. (2009). Developmental Exposure to Chlorpyrifos Induces Alterations in Thyroid and Thyroid Hormone Levels without Other Toxicity Signs in Cd1 Mice. *Toxicol Sci*.
- De Ferrari, G. V., Mallender, W. D., Inestrosa, N. C., and Rosenberry, T. L. (2001). Thioflavin T is a fluorescent probe of the acetylcholinesterase peripheral site that reveals conformational interactions between the peripheral and acylation sites. *J Biol Chem* **276**, 23282-23287.
- De Vry, J. (1995). 5-HT1A receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl)* **121**, 1-26.
- Deacon, R. M., Bannerman, D. M., Kirby, B. P., Croucher, A., and Rawlins, J. N. (2002). Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav Brain Res* **133**, 57-68.
- Den Hond, E., and Schoeters, G. (2006). Endocrine disrupters and human puberty. *Int J Androl* **29**, 264-271; discussion 286-290.
- Denenberg, V. H., Talgo, N., Carroll, D. A., Freter, S., and Deni, R. (1991). A computer-aided procedure for measuring Lashley III maze performance. *Physiol Behav* **50**, 857-861.
- Dobbing, J. (1974). The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* **53**, 2-6.
- Dobbing, J., and Sands, J. (1973). Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* **48**, 757-767.
- Domoradzki, J. Y., Thornton, C. M., Pottenger, L. H., Hansen, S. C., Card, T. L., Markham, D. A., Dryzga, M. D., Shiotsuka, R. N., and Waechter, J. M., Jr. (2004). Age and dose dependency of the pharmacokinetics and metabolism of bisphenol A in neonatal sprague-dawley rats following oral administration. *Toxicol Sci* **77**, 230-242.
- Domschke, K., and Zwanzger, P. (2008). GABAergic and endocannabinoid dysfunction in anxiety - future therapeutic targets? *Curr Pharm Des* **14**, 3508-3517.

- Drews, U. (1975). Cholinesterase in embryonic development. *Prog Histochem Cytochem* **7**, 1-52.
- Eichenbaum, H., and Lipton, P. A. (2008). Towards a functional organization of the medial temporal lobe memory system: role of the parahippocampal and medial entorhinal cortical areas. *Hippocampus* **18**, 1314-1324.
- Emerit, M. B., Riad, M., and Hamon, M. (1992). Trophic effects of neurotransmitters during brain maturation. *Biol Neonate* **62**, 193-201.
- Engel, S. M., Berkowitz, G. S., Barr, D. B., Teitelbaum, S. L., Siskind, J., Meisel, S. J., Wetmur, J. G., and Wolff, M. S. (2007). Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *Am J Epidemiol* **165**, 1397-1404.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., and Chazot, P. L. (2006a). Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res* **171**, 26-49.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., van Rensburg, R., and Chazot, P. L. (2006b). Models of anxiety: responses of mice to novelty and open spaces in a 3D maze. *Behav Brain Res* **174**, 9-38.
- Eriksson, P. (1997). Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. *Neurotoxicology* **18**, 719-726.
- Eriksson, P., Ahlbom, J., and Fredriksson, A. (1992). Exposure to DDT during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res* **582**, 277-281.
- Eriksson, P., Nilsson-Hakansson, L., Nordberg, A., Aspberg, A., and Fredriksson, A. (1990). Neonatal exposure to DDT and its fatty acid conjugate: effects on cholinergic and behavioural variables in the adult mouse. *Neurotoxicology* **11**, 345-354.
- Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D. B., Johnson, C., Morga, N., and Jewell, N. P. (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect* **115**, 792-798.
- Eskenazi, B., Rosas, L. G., Marks, A. R., Bradman, A., Harley, K., Holland, N., Johnson, C., Fenster, L., and Barr, D. B. (2008). Pesticide toxicity and the developing brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**, 228-236.
- Foley, A. G., Ronn, L. C., Murphy, K. J., and Regan, C. M. (2003). Distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat septal nuclei and septohippocampal pathway: transient increase of polysialylated interneurons in the subtriangular septal zone during memory consolidation. *J Neurosci Res* **74**, 807-817.
- Fox, D. A., Campbell, M. L., and Blocker, Y. S. (1997). Functional alterations and apoptotic cell death in the retina following developmental or adult lead exposure. *Neurotoxicology* **18**, 645-664.
- Frischer, R. E., King, J. A., Rose, K. J., and Strand, F. L. (1988). Maturation changes in neonatal rat motor system with early postnatal administration of nicotine. *Int J Dev Neurosci* **6**, 149-154.
- Frye, C. A., Koonce, C. J., Edinger, K. L., Osborne, D. M., and Walf, A. A. (2008). Androgens with activity at estrogen receptor beta have anxiolytic and cognitive-enhancing effects in male rats and mice. *Horm Behav* **54**, 726-734.
- Gangitano, D., Salas, R., Teng, Y., Perez, E., and De Biasi, M. (2009). Progesterone modulation of alpha5 nAChR subunits influences anxiety-related behavior during estrus cycle. *Genes Brain Behav*.
- Garcia, S. J., Seidler, F. J., Crumpton, T. L., and Slotkin, T. A. (2001). Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells. *Brain Res* **891**, 54-68.

- Garcia, S. J., Seidler, F. J., Qiao, D., and Slotkin, T. A. (2002). Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Brain Res Dev Brain Res* **133**, 151-161.
- Garcia, S. J., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2003). Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities. *Environ Health Perspect* **111**, 297-303.
- Gerlai, R. (1998). A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. *Behav Brain Res* **95**, 91-101.
- Ginsberg, G., Hattis, D., and Sonawane, B. (2004). Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**, 164-183.
- Grandjean, P., and Landrigan, P. J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368**, 2167-2178.
- Griebel, G. (1995). 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* **65**, 319-395.
- Grifman, M., Galyam, N., Seidman, S., and Soreq, H. (1998). Functional redundancy of acetylcholinesterase and neurexins in mammalian neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13935-13940.
- Grigoriadis, S., and Robinson, G. E. (2007). Gender issues in depression. *Ann Clin Psychiatry* **19**, 247-255.
- Grisaru, D., Sternfeld, M., Eldor, A., Glick, D., and Soreq, H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* **264**, 672-686.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., and Hen, R. (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* **416**, 396-400.
- Grundmann, O., Nakajima, J., Seo, S., and Butterweck, V. (2007). Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol* **110**, 406-411.
- Guerri, C. (1998). Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* **22**, 304-312.
- Guillette, E. A., Meza, M. M., Aquilar, M. G., Soto, A. D., and Garcia, I. E. (1998). An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. *Environ Health Perspect* **106**, 347-353.
- Guizzetti, M., Pathak, S., Giordano, G., and Costa, L. G. (2005). Effect of organophosphorus insecticides and their metabolites on astroglial cell proliferation. *Toxicology* **215**, 182-190.
- Gurunathan, S., Robson, M., Freeman, N., Buckley, B., Roy, A., Meyer, R., Bukowski, J., and Lioy, P. J. (1998). Accumulation of chlorpyrifos on residential surfaces and toys accessible to children. *Environ Health Perspect* **106**, 9-16.
- Harry, G. J., Toews, A. D., Krigman, M. R., and Morell, P. (1985). The effect of lead toxicity and milk deprivation of myelination in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* **77**, 458-464.
- Hata, T., Nishikawa, H., Itoh, E., and Funakami, Y. (2001). Anxiety-like behavior in elevated plus-maze tests in repeatedly cold-stressed mice. *Jpn J Pharmacol* **85**, 189-196.
- Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., and Tecott, L. H. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15049-15054.
- Hoff, S. F. (1988). Synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus: effects of in utero ethanol exposure. *Brain Res Bull* **21**, 47-54.

- Hoffman, P. L., and Tabakoff, B. (1996). To be or not to be: how ethanol can affect neuronal death during development. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 193-195.
- Holmes, A., Murphy, D. L., and Crawley, J. N. (2003a). Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry* **54**, 953-959.
- Holmes, A., Yang, R. J., Lesch, K. P., Crawley, J. N., and Murphy, D. L. (2003b). Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* **28**, 2077-2088.
- Howard, A. S., Bucelli, R., Jett, D. A., Bruun, D., Yang, D., and Lein, P. J. (2005). Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 112-124.
- Huff, R. A., and Abou-Donia, M. B. (1995). In vitro effect of chlorpyrifos oxon on muscarinic receptors and adenylate cyclase. *Neurotoxicology* **16**, 281-290.
- Huff, R. A., Corcoran, J. J., Anderson, J. K., and Abou-Donia, M. B. (1994). Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 329-335.
- Hunter, S. F., Leavitt, J. A., and Rodriguez, M. (1997). Direct observation of myelination in vivo in the mature human central nervous system. A model for the behaviour of oligodendrocyte progenitors and their progeny. *Brain* **120 (Pt 11)**, 2071-2082.
- Huttenlocher, P. R., and de Courten, C. (1987). The development of synapses in striate cortex of man. *Hum Neurobiol* **6**, 1-9.
- Icenogle, L. M., Christopher, N. C., Blackwelder, W. P., Caldwell, D. P., Qiao, D., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., and Levin, E. D. (2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicol Teratol* **26**, 95-101.
- Ikeda, Y., Nishiyama, N., Saito, H., and Katsuki, H. (1997). GABAA receptor stimulation promotes survival of embryonic rat striatal neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res* **98**, 253-258.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., and Barros, D. M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* **103**, 1-11.
- Jaga, K., and Dharmani, C. (2007). The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. *Rev Environ Health* **22**, 57-73.
- Jameson, R. R., Seidler, F. J., Qiao, D., and Slotkin, T. A. (2006). Chlorpyrifos affects phenotypic outcomes in a model of mammalian neurodevelopment: critical stages targeting differentiation in PC12 cells. *Environ Health Perspect* **114**, 667-672.
- Jameson, R. R., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2007). Nonenzymatic functions of acetylcholinesterase splice variants in the developmental neurotoxicity of organophosphates: chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon, and diazinon. *Environ Health Perspect* **115**, 65-70.
- Jiang, H., and Zhang, X. J. (2008). Acetylcholinesterase and apoptosis. A novel perspective for an old enzyme. *FEBS J* **275**, 612-617.
- Johnson, E. M., Jr., and Deckwerth, T. L. (1993). Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* **16**, 31-46.
- Johnson, F. O., Chambers, J. E., Nail, C. A., Givaruangawat, S., and Carr, R. L. (2009). Developmental Chlorpyrifos and Methyl Parathion Exposure Alters Radial Arm Maze Performance in Juvenile and Adult Rats. *Toxicol Sci*.
- Johnson, T. N. (2003). The development of drug metabolising enzymes and their influence on the susceptibility to adverse drug reactions in children. *Toxicology* **192**, 37-48.

- Jung, J. W., Ahn, N. Y., Oh, H. R., Lee, B. K., Lee, K. J., Kim, S. Y., Cheong, J. H., and Ryu, J. H. (2006). Anxiolytic effects of the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla*. *J Ethnopharmacol* **108**, 193-197.
- Kamel, F., and Hoppin, J. A. (2004). Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ Health Perspect* **112**, 950-958.
- Kamrin, M. A. (1997). Environmental risk harmonization: federal/state approaches to risk assessment and management. *Regul Toxicol Pharmacol* **25**, 158-165.
- Karpel, R., Ben Aziz-Aloya, R., Sternfeld, M., Ehrlich, G., Ginzberg, D., Tarroni, P., Clementi, F., Zakut, H., and Soreq, H. (1994). Expression of three alternative acetylcholinesterase messenger RNAs in human tumor cell lines of different tissue origins. *Exp Cell Res* **210**, 268-277.
- Karpel, R., Sternfeld, M., Ginzberg, D., Guhl, E., Graessmann, A., and Soreq, H. (1996). Overexpression of alternative human acetylcholinesterase forms modulates process extensions in cultured glioma cells. *J Neurochem* **66**, 114-123.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., and Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature* **393**, 373-377.
- Keifer, M. C., and Mahurin, R. K. (1997). Chronic neurologic effects of pesticide overexposure. *Occup Med* **12**, 291-304.
- Klemenhagen, K. C., Gordon, J. A., David, D. J., Hen, R., and Gross, C. T. (2006). Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT1A receptor. *Neuropsychopharmacology* **31**, 101-111.
- Kocsis, J. J., Harkaway, S., and Snyder, R. (1975). Biological effects of the metabolites of dimethyl sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* **243**, 104-109.
- Koenigsberger, C., Hammond, P., and Brimijoin, S. (1998). Developmental expression of acetyl- and butyrylcholinesterase in the rat: enzyme and mRNA levels in embryonic dorsal root ganglia. *Brain Res* **787**, 248-258.
- Kornstein, S. G. (1997). Gender differences in depression: implications for treatment. *J Clin Psychiatry* **58 Suppl 15**, 12-18.
- Kostovic, I., and Goldman-Rakic, P. S. (1983). Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. *J Comp Neurol* **219**, 431-447.
- Kousba, A. A., Poet, T. S., and Timchalk, C. (2007). Age-related brain cholinesterase inhibition kinetics following in vitro incubation with chlorpyrifos-oxon and diazinon-oxon. *Toxicol Sci* **95**, 147-155.
- Kousba, A. A., Sultatos, L. G., Poet, T. S., and Timchalk, C. (2004). Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site. *Toxicol Sci* **80**, 239-248.
- Krueger, K. E. (1995). Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 453-470.
- Krueger, K. E., and Papadopoulos, V. (1990). Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* **265**, 15015-15022.
- Kulkarni, S. K., and Sharma, K. (1993). Alprazolam modifies animal behaviour on elevated plus-maze. *Indian J Exp Biol* **31**, 908-911.
- Kusserow, H., Davies, B., Hortnagl, H., Voigt, I., Stroh, T., Bert, B., Deng, D. R., Fink, H., Veh, R. W., and Theuring, F. (2004). Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **129**, 104-116.
- Kwong, T. C. (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit* **24**, 144-149.

- Laev, H., Karpiak, S. E., Gokhale, V. S., and Hungund, B. L. (1995). In utero ethanol exposure retards growth and alters morphology of cortical cultures: GM1 reverses effects. *Alcohol Clin Exp Res* **19**, 1226-1233.
- Lalonde, R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 91-104.
- Lancaster, F., Delaney, C., and Samorajski, T. (1989). Synaptic density of caudate-putamen and visual cortex following exposure to ethanol in utero. *Int J Dev Neurosci* **7**, 581-589.
- Lancaster, F. E., Mayur, B. K., Patsalos, P. N., Samorajski, T., and Wiggins, R. C. (1982). The synthesis of myelin and brain subcellular membrane proteins in the offspring of rats fed ethanol during pregnancy. *Brain Res* **235**, 105-113.
- Lassiter, T. L., Padilla, S., Mortensen, S. R., Chanda, S. M., Moser, V. C., and Barone, S., Jr. (1998). Gestational exposure to chlorpyrifos: apparent protection of the fetus? *Toxicol Appl Pharmacol* **152**, 56-65.
- Lauder, J. M. (1988). Neurotransmitters as morphogens. *Prog Brain Res* **73**, 365-387.
- Lauder, J. M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci* **600**, 297-313; discussion 314.
- Lauder, J. M., and Schambra, U. B. (1999). Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 1**, 65-69.
- Lauder, J. M., Towle, A. C., Patrick, K., Henderson, P., and Krebs, H. (1985). Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: a quantitative immunocytochemical study. *Brain Res* **352**, 107-114.
- Layer, P. G. (1990a). Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays* **12**, 415-420.
- Layer, P. G. (1990b). Cholinesterases reveal early patterns of neurogenesis in the chick. *Acta Histochem Suppl* **38**, 145-150.
- Layer, P. G., and Sporns, O. (1987). Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 284-288.
- Layer, P. G., and Willbold, E. (1994). Cholinesterases in avian neurogenesis. *Int Rev Cytol* **151**, 139-181.
- Layer, P. G., and Willbold, E. (1995). Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Histochem Cytochem* **29**, 1-94.
- Leonardo, E. D., and Hen, R. (2008). Anxiety as a developmental disorder. *Neuropsychopharmacology* **33**, 134-140.
- Lesch, K. P. (1991). 5-HT_{1A} receptor responsivity in anxiety disorders and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **15**, 723-733.
- Levin, E. D., Addy, N., Baruah, A., Elias, A., Christopher, N. C., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol* **24**, 733-741.
- Levin, E. D., Addy, N., Nakajima, A., Christopher, N. C., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2001). Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposure in rats. *Brain Res Dev Brain Res* **130**, 83-89.
- Levitt, P. (1998). Prenatal effects of drugs of abuse on brain development. *Drug Alcohol Depend* **51**, 109-125.
- Levitt, P., Harvey, J. A., Friedman, E., Simansky, K., and Murphy, E. H. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci* **20**, 269-274.

- Liesi, P. (1997). Ethanol-exposed central neurons fail to migrate and undergo apoptosis. *J Neurosci Res* **48**, 439-448.
- Lockridge, O., and Masson, P. (2000). Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology* **21**, 113-126.
- Loizou, L. A. (1972). The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Res* **40**, 395-418.
- Lotti, M. (1995). Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin Chem* **41**, 1814-1818.
- Lotti, M. (2002). Low-level exposures to organophosphorus esters and peripheral nerve function. *Muscle Nerve* **25**, 492-504.
- Lotti, M., Moretto, A., Bertolazzi, M., Peraica, M., and Fioroni, F. (1995). Organophosphate polyneuropathy and neuropathy target esterase: studies with methamidophos and its resolved optical isomers. *Arch Toxicol* **69**, 330-336.
- LoTurco, J. J., Owens, D. F., Heath, M. J., Davis, M. B., and Kriegstein, A. R. (1995). GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* **15**, 1287-1298.
- Lu, F. C. (1995). A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO. *Regul Toxicol Pharmacol* **21**, 352-364.
- Lucki, I., Singh, A., and Kreiss, D. S. (1994). Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists. *Neurosci Biobehav Rev* **18**, 85-95.
- Ma, T., and Chambers, J. E. (1994). Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes. *Food Chem Toxicol* **32**, 763-767.
- Majercsik, E., Haller, J., Leveleki, C., Baranyi, J., Halasz, J., and Rodgers, R. J. (2003). The effect of social factors on the anxiolytic efficacy of buspirone in male rats, male mice, and men. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 1187-1199.
- Marty, M. S., Domoradzki, J. Y., Hansen, S. C., Timchalk, C., Bartels, M. J., and Mattsson, J. L. (2007). The effect of route, vehicle, and divided doses on the pharmacokinetics of chlorpyrifos and its metabolite trichloropyridinol in neonatal Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* **100**, 360-373.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., and Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* **41**, 31-91.
- Mattsson, J. L., Maurissen, J. P., Nolan, R. J., and Brzak, K. A. (2000). Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos. *Toxicol Sci* **53**, 438-446.
- Matzel, L. D., Han, Y. R., Grossman, H., Karnik, M. S., Patel, D., Scott, N., Specht, S. M., and Gandhi, C. C. (2003). Individual differences in the expression of a "general" learning ability in mice. *J Neurosci* **23**, 6423-6433.
- Maurissen, J. P., Hoberman, A. M., Garman, R. H., and Hanley, T. R., Jr. (2000). Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos. *Toxicol Sci* **57**, 250-263.
- Mazer, C., Muneyyirci, J., Taheny, K., Raio, N., Borella, A., and Whitaker-Azmitia, P. (1997). Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res* **760**, 68-73.
- McCauley, P. T., Bull, R. J., Tonti, A. P., Lutkenhoff, S. D., Meister, M. V., Doerger, J. U., and Stober, J. A. (1982). The effect of prenatal and postnatal lead exposure on neonatal synaptogenesis in rat cerebral cortex. *J Toxicol Environ Health* **10**, 639-651.
- McCollister, S. B., Kociba, R. J., Humiston, C. G., and McCollister, D. D. (1974). Studies on the acute and long-term oral toxicity of chlorpyrifos (0,0-diethyl-0(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate). *Food Cosmet Toxicol* **12**, 45-61.

- McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S., and Sakai, R. R. (1995). Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry* **37**, 383-393.
- Meyer, A., Seidler, F. J., Aldridge, J. E., Tate, C. A., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A. (2004). Critical periods for chlorpyrifos-induced developmental neurotoxicity: alterations in adenylyl cyclase signaling in adult rat brain regions after gestational or neonatal exposure. *Environ Health Perspect* **112**, 295-301.
- Milesion, B. E., Chambers, J. E., Chen, W. L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A. T., Gaylor, D. W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karczmar, A. G., Padilla, S., Pope, C. N., Richardson, R. J., Saunders, D. R., Sheets, L. P., Sultatos, L. G., and Wallace, K. B. (1998). Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol Sci* **41**, 8-20.
- Miller, M. W. (1996). Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 139-143.
- Miller, R. H., and Ono, K. (1998). Morphological analysis of the early stages of oligodendrocyte development in the vertebrate central nervous system. *Microsc Res Tech* **41**, 441-453.
- Mission, J. P., Takahashi, T., and Caviness, V. S., Jr. (1991). Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* **4**, 138-148.
- Mohler, H. (2006). GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* **26**, 731-740.
- Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Schilter, B., Costa, L. G., and Honegger, P. (2000). Maturation-dependent effects of chlorpyrifos and parathion and their oxygen analogs on acetylcholinesterase and neuronal and glial markers in aggregating brain cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* **165**, 175-183.
- Moretto, A. (1998). Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. *Toxicol Lett* **102-103**, 509-513.
- Mortensen, S. R., Hooper, M. J., and Padilla, S. (1998). Rat brain acetylcholinesterase activity: developmental profile and maturational sensitivity to carbamate and organophosphorus inhibitors. *Toxicology* **125**, 13-19.
- Moser, V. C. (2000). Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. *Neurotoxicol Teratol* **22**, 713-723.
- Moser, V. C., Chanda, S. M., Mortensen, S. R., and Padilla, S. (1998). Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol Sci* **46**, 211-222.
- Moser, V. C., and Padilla, S. (1998). Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **149**, 107-119.
- Mueller, R. F., Hornung, S., Furlong, C. E., Anderson, J., Giblett, E. R., and Motulsky, A. G. (1983). Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies. *Am J Hum Genet* **35**, 393-408.
- Murphy, D. L. (1990). Neuropsychiatric disorders and the multiple human brain serotonin receptor subtypes and subsystems. *Neuropsychopharmacology* **3**, 457-471.
- Nagashima, K. (1997). A review of experimental methylmercury toxicity in rats: neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicol Pathol* **25**, 624-631.
- Nguyen, L., Rigo, J. M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., and Moonen, G. (2001). Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* **305**, 187-202.

- Nguyen, T., and Sudhof, T. C. (1997). Binding properties of neuroligin 1 and neuroligin 2 reveal function as heterophilic cell adhesion molecules. *J Biol Chem* **272**, 26032-26039.
- Oberto, A., Marks, N., Evans, H. L., and Guidotti, A. (1996). Lead (Pb²⁺) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J Pharmacol Exp Ther* **279**, 435-442.
- Ogren, S. O., Eriksson, T. M., Elvander-Tottie, E., D'Addario, C., Ekstrom, J. C., Svenningsson, P., Meister, B., Kehr, J., and Stiedl, O. (2008). The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behav Brain Res* **195**, 54-77.
- Olivier, K., Jr., Liu, J., and Pope, C. (2001). Inhibition of forskolin-stimulated cAMP formation in vitro by paraoxon and chlorpyrifos oxon in cortical slices from neonatal, juvenile, and adult rats. *J Biochem Mol Toxicol* **15**, 263-269.
- Palanza, P. (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Biobehav Rev* **25**, 219-233.
- Papadopoulos, V., Lecanu, L., Brown, R. C., Han, Z., and Yao, Z. X. (2006). Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders. *Neuroscience* **138**, 749-756.
- Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T., and Toth, M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10734-10739.
- Paus, T., Zijdenbos, A., Worsley, K., Collins, D. L., Blumenthal, J., Giedd, J. N., Rapoport, J. L., and Evans, A. C. (1999). Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* **283**, 1908-1911.
- Pazos, A., and Palacios, J. M. (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* **346**, 205-230.
- Pennington, S. N., Sandstrom, L. P., Shibley, I. A., Jr., Long, S. D., Beeker, K. R., Smith, C. P., Jr., Lee, K., Jones, T. A., Cummings, K. M., and Means, L. W. (1994). Biochemical changes, early brain growth suppression and impaired detour learning in nicotine-treated chicks. *Brain Res Dev Brain Res* **83**, 181-189.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., and Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* **177**, 245-255.
- Petit, T. L., Alfano, D. P., and LeBoutillier, J. C. (1983). Early lead exposure and the hippocampus: a review and recent advances. *Neurotoxicology* **4**, 79-94.
- Petit, T. L., and LeBoutillier, J. C. (1979). Effects of lead exposure during development on neocortical dendritic and synaptic structure. *Exp Neurol* **64**, 482-492.
- Philbert, M. A., Billingsley, M. L., and Reuhl, K. R. (2000). Mechanisms of injury in the central nervous system. *Toxicol Pathol* **28**, 43-53.
- Pittenger, C., and Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **33**, 88-109.
- Poet, T. S., Wu, H., Kousba, A. A., and Timchalk, C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicol Sci* **72**, 193-200.
- Pompeiano, M., Palacios, J. M., and Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* **12**, 440-453.
- Ponce, R. A., Kavanagh, T. J., Mottet, N. K., Whittaker, S. G., and Faustman, E. M. (1994). Effects of methyl mercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* **127**, 83-90.
- Pope, C. N., and Chakraborti, T. K. (1992). Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures. *Toxicology* **73**, 35-43.

- Pope, C. N., Chakraborti, T. K., Chapman, M. L., and Farrar, J. D. (1992). Long-term neurochemical and behavioral effects induced by acute chlorpyrifos treatment. *Pharmacol Biochem Behav* **42**, 251-256.
- Pope, C. N., Chakraborti, T. K., Chapman, M. L., Farrar, J. D., and Arthun, D. (1991). Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. *Toxicology* **68**, 51-61.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., and Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **229**, 327-336.
- Qiao, D., Seidler, F. J., Abreu-Villaca, Y., Tate, C. A., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A. (2004). Chlorpyrifos exposure during neurulation: cholinergic synaptic dysfunction and cellular alterations in brain regions at adolescence and adulthood. *Brain Res Dev Brain Res* **148**, 43-52.
- Qiao, D., Seidler, F. J., Padilla, S., and Slotkin, T. A. (2002). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: what is the vulnerable period? *Environ Health Perspect* **110**, 1097-1103.
- Qiao, D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2001). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environ Health Perspect* **109**, 909-913.
- Qiao, D., Seidler, F. J., Tate, C. A., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A. (2003). Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect* **111**, 536-544.
- Quertemont, E., Tambour, S., Bernaerts, P., Zimatkin, S. M., and Tirelli, E. (2004). Behavioral characterization of acetaldehyde in C57BL/6J mice: locomotor, hypnotic, anxiolytic and amnesic effects. *Psychopharmacology (Berl)* **177**, 84-92.
- Radley, J. J., Sisti, H. M., Hao, J., Rocher, A. B., McCall, T., Hof, P. R., McEwen, B. S., and Morrison, J. H. (2004). Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **125**, 1-6.
- Raines, K. W., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2001). Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. *Brain Res Dev Brain Res* **130**, 65-72.
- Rakic, P., and Caviness, V. S., Jr. (1995). Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* **14**, 1101-1104.
- Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D. A., Kung, H. F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J. J., Brunner, D., and Hen, R. (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14476-14481.
- Rauh, V. A., Garfinkel, R., Perera, F. P., Andrews, H. F., Hoepner, L., Barr, D. B., Whitehead, R., Tang, D., and Whyatt, R. W. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* **118**, e1845-1859.
- Retz, W., Kornhuber, J., and Riederer, P. (1996). Neurotransmission and the ontogeny of human brain. *J Neural Transm* **103**, 403-419.
- Reynolds, D. S., Rosahl, T. W., Cirone, J., O'Meara, G. F., Haythornthwaite, A., Newman, R. J., Myers, J., Sur, C., Howell, O., Rutter, A. R., Atack, J., Macaulay, A. J., Hadingham, K. L., Hutson, P. H., Belelli, D., Lambert, J. J., Dawson, G. R., McKernan, R., Whiting, P. J., and Wafford, K. A. (2003). Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *J Neurosci* **23**, 8608-8617.

- Ricceri, L., Cutuli, D., Venerosi, A., Scattoni, M. L., and Calamandrei, G. (2007). Neonatal basal forebrain cholinergic hypofunction affects ultrasonic vocalizations and fear conditioning responses in preweaning rats. *Behav Brain Res* **183**, 111-117.
- Ricceri, L., Markina, N., Valanzano, A., Fortuna, S., Cometa, M. F., Meneguz, A., and Calamandrei, G. (2003). Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **191**, 189-201.
- Ricceri, L., Venerosi, A., Capone, F., Cometa, M. F., Lorenzini, P., Fortuna, S., and Calamandrei, G. (2006). Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicol Sci* **93**, 105-113.
- Rice, D., and Barone, S., Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* **108 Suppl 3**, 511-533.
- Riley, E. P., Mattson, S. N., Sowell, E. R., Jernigan, T. L., Sobel, D. F., and Jones, K. L. (1995). Abnormalities of the corpus callosum in children prenatally exposed to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* **19**, 1198-1202.
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratieck, C., and Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J Neurosci* **19**, 4337-4348.
- Robertson, R. T. (1987). A morphogenic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems? *Neurosci Lett* **75**, 259-264.
- Rodier, P. M. (1980). Chronology of neuron development: animal studies and their clinical implications. *Dev Med Child Neurol* **22**, 525-545.
- Rodier, P. M. (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 6**, 73-76.
- Rodier, P. M., Aschner, M., and Sager, P. R. (1984). Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. *Neurobehav Toxicol Teratol* **6**, 379-385.
- Roegge, C. S., Timofeeva, O. A., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., and Levin, E. D. (2008). Developmental diazinon neurotoxicity in rats: later effects on emotional response. *Brain Res Bull* **75**, 166-172.
- Rosas, L. G., and Eskenazi, B. (2008). Pesticides and child neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr* **20**, 191-197.
- Rose, S. P. (1995). Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends Neurosci* **18**, 502-506.
- Rosenfeld, C. A., and Sultatos, L. G. (2006). Concentration-dependent kinetics of acetylcholinesterase inhibition by the organophosphate paraoxon. *Toxicol Sci* **90**, 460-469.
- Rosengarten, H., and Friedhoff, A. J. (1979). Enduring changes in dopamine receptor cells of pups from drug administration to pregnant and nursing rats. *Science* **203**, 1133-1135.
- Rothenberg, S. J., Poblano, A., and Garza-Morales, S. (1994). Prenatal and perinatal low level lead exposure alters brainstem auditory evoked responses in infants. *Neurotoxicology* **15**, 695-699.
- Roy, T. S., Andrews, J. E., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1998a). Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology* **58**, 62-68.
- Roy, T. S., Andrews, J. E., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1998b). Nicotine evokes cell death in embryonic rat brain during neurulation. *J Pharmacol Exp Ther* **287**, 1136-1144.

- Roy, T. S., Sharma, V., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2005). Quantitative morphological assessment reveals neuronal and glial deficits in hippocampus after a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res* **155**, 71-80.
- Ruckart, P. Z., Kakolewski, K., Bove, F. J., and Kaye, W. E. (2004). Long-term neurobehavioral health effects of methyl parathion exposure in children in Mississippi and Ohio. *Environ Health Perspect* **112**, 46-51.
- Sah, D. W., Ray, J., and Gage, F. H. (1997). Regulation of voltage- and ligand-gated currents in rat hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurobiol* **32**, 95-110.
- Salvi, R. M., Lara, D. R., Ghisolfi, E. S., Portela, L. V., Dias, R. D., and Souza, D. O. (2003). Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Sci* **72**, 267-271.
- 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**, 805-809.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., and Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* **65**, 1035-1041.
- Savage, E. P., Keefe, T. J., Mounce, L. M., Heaton, R. K., Lewis, J. A., and Burcar, P. J. (1988). Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. *Arch Environ Health* **43**, 38-45.
- Schoeters, G., and Hoogenboom, R. (2006). Contamination of free-range chicken eggs with dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Mol Nutr Food Res* **50**, 908-914.
- Schuh, R. A., Lein, P. J., Beckles, R. A., and Jett, D. A. (2002). Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**, 176-185.
- Schwarz, M., Loewenstein-Lichtenstein, Y., Glick, D., Liao, J., Norgaard-Pedersen, B., and Soreq, H. (1995). Successive organophosphate inhibition and oxime reactivation reveals distinct responses of recombinant human cholinesterase variants. *Brain Res Mol Brain Res* **31**, 101-110.
- Sharma, K. V., and Bigbee, J. W. (1998). Acetylcholinesterase antibody treatment results in neurite detachment and reduced outgrowth from cultured neurons: further evidence for a cell adhesive role for neuronal acetylcholinesterase. *J Neurosci Res* **53**, 454-464.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., and Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* **116**, 56-64.
- Sheth, A., Berretta, S., Lange, N., and Eichenbaum, H. (2008). The amygdala modulates neuronal activation in the hippocampus in response to spatial novelty. *Hippocampus* **18**, 169-181.
- Sibille, E., Pavlides, C., Benke, D., and Toth, M. (2000). Genetic inactivation of the Serotonin(1A) receptor in mice results in downregulation of major GABA(A) receptor alpha subunits, reduction of GABA(A) receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety. *J Neurosci* **20**, 2758-2765.
- Sidell, F. R. (1974). Soman and sarin: clinical manifestations and treatment of accidental poisoning by organophosphates. *Clin Toxicol* **7**, 1-17.
- Slotkin, T., and Seidler, F. (2008a). Transcriptional profiles reveal similarities and differences in the effects of developmental neurotoxicants on differentiation into neurotransmitter phenotypes in PC12 cells. *Brain Res Bull.*

- Slotkin, T. A. (1999). Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 1**, 71-80.
- Slotkin, T. A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol* **198**, 132-151.
- Slotkin, T. A. (2008). If nicotine is a developmental neurotoxicant in animal studies, dare we recommend nicotine replacement therapy in pregnant women and adolescents? *Neurotoxicol Teratol* **30**, 1-19.
- Slotkin, T. A., Bodwell, B. E., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2008a). Neonatal exposure to low doses of diazinon: long-term effects on neural cell development and acetylcholine systems. *Environ Health Perspect* **116**, 340-348.
- Slotkin, T. A., Lappi, S. E., and Seidler, F. J. (1993). Impact of fetal nicotine exposure on development of rat brain regions: critical sensitive periods or effects of withdrawal? *Brain Res Bull* **31**, 319-328.
- Slotkin, T. A., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2008b). Developmental neurotoxicity of parathion: Progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicol Teratol*.
- Slotkin, T. A., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2009). Developmental neurotoxicity of parathion: Progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicol Teratol* **31**, 11-17.
- Slotkin, T. A., MacKillop, E. A., Ryde, I. T., Tate, C. A., and Seidler, F. J. (2007a). Screening for developmental neurotoxicity using PC12 cells: comparisons of organophosphates with a carbamate, an organochlorine, and divalent nickel. *Environ Health Perspect* **115**, 93-101.
- Slotkin, T. A., Ryde, I. T., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2008c). Developmental neurotoxicity of low dose diazinon exposure of neonatal rats: effects on serotonin systems in adolescence and adulthood. *Brain Res Bull* **75**, 640-647.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2005). The alterations in CNS serotonergic mechanisms caused by neonatal chlorpyrifos exposure are permanent. *Brain Res Dev Brain Res* **158**, 115-119.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2007a). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull* **72**, 232-274.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2007b). Developmental exposure to terbutaline and chlorpyrifos, separately or sequentially, elicits presynaptic serotonergic hyperactivity in juvenile and adolescent rats. *Brain Res Bull* **73**, 301-309.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2007c). Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic serotonergic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: critical periods for regional and sex-selective effects. *Reprod Toxicol* **23**, 421-427.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2008b). Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicol Appl Pharmacol* **233**, 211-219.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2008c). Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., and Fumagalli, F. (2007b). Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. *Environ Health Perspect* **115**, 909-916.

- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., and Fumagalli, F. (2008d). Targeting of neurotrophic factors, their receptors, and signaling pathways in the developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo and in vitro. *Brain Res Bull* **76**, 424-438.
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., and Fumagalli, F. (2008e). Unrelated developmental neurotoxicants elicit similar transcriptional profiles for effects on neurotrophic factors and their receptors in an in vitro model. *Neurotoxicol Teratol*.
- Slotkin, T. A., Seidler, F. J., Ryde, I. T., and Yanai, J. (2008f). Developmental neurotoxic effects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. *Neurotoxicol Teratol* **30**, 433-439.
- Slotkin, T. A., Tate, C. A., Ryde, I. T., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2006). Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect* **114**, 1542-1546.
- Snedeker, S. M. (2001). Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ Health Perspect* **109 Suppl 1**, 35-47.
- Song, M., and Messing, R. O. (2005). Protein kinase C regulation of GABAA receptors. *Cell Mol Life Sci* **62**, 119-127.
- Song, X., Seidler, F. J., Saleh, J. L., Zhang, J., Padilla, S., and Slotkin, T. A. (1997). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol Appl Pharmacol* **145**, 158-174.
- Song, X., Violin, J. D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1998). Modeling the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vitro: macromolecule synthesis in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **151**, 182-191.
- Soriano, E., Alvarado-Mallart, R. M., Dumesnil, N., Del Rio, J. A., and Sotelo, C. (1997). Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron* **18**, 563-577.
- Stavnezer, A. J., McDowell, C. S., Hyde, L. A., Bimonte, H. A., Balogh, S. A., Hoplight, B. J., and Denenberg, V. H. (2000). Spatial ability of XY sex-reversed female mice. *Behav Brain Res* **112**, 135-143.
- Stepan, R., Ticha, J., Hajslova, J., Kovalczuk, T., and Kocourek, V. (2005). Baby food production chain: pesticide residues in fresh apples and products. *Food Addit Contam* **22**, 1231-1242.
- Stockmeier, C. A., Mahajan, G. J., Konick, L. C., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Meltzer, H. Y., Uylings, H. B., Friedman, L., and Rajkowska, G. (2004). Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* **56**, 640-650.
- Sundstrom, R., and Karlsson, B. (1987). Myelin basic protein in brains of rats with low dose lead encephalopathy. *Arch Toxicol* **59**, 341-345.
- Talbot, P. S. (2004). The molecular neuroimaging of anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* **6**, 274-279.
- Tambour, S., Didone, V., Tirelli, E., and Quertemont, E. (2005). Dissociation between the locomotor and anxiolytic effects of acetaldehyde in the elevated plus-maze: evidence that acetaldehyde is not involved in the anxiolytic effects of ethanol in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* **15**, 655-662.
- Timchalk, C., Kousba, A. A., and Poet, T. S. (2007). An age-dependent physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in the preweanling rat. *Toxicol Sci* **98**, 348-365.
- Timchalk, C., Poet, T. S., and Kousba, A. A. (2006). Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicology* **220**, 13-25.

- Timofeeva, O. A., Roegge, C. S., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., and Levin, E. D. (2008a). Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. *Neurotoxicol Teratol* **30**, 38-45.
- Timofeeva, O. A., Sanders, D., Seemann, K., Yang, L., Hermanson, D., Regenbogen, S., Agoos, S., Kallepalli, A., Rastogi, A., Braddy, D., Wells, C., Perraut, C., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., and Levin, E. D. (2008b). Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. *Brain Res Bull.*
- Valles, S., Pitarch, J., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1997). Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. *J Neurochem* **69**, 2484-2493.
- Valles, S., Sancho-Tello, M., Minana, R., Climent, E., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1996). Glial fibrillary acidic protein expression in rat brain and in radial glia culture is delayed by prenatal ethanol exposure. *J Neurochem* **67**, 2425-2433.
- Van Kolen, K., Pullan, S., Neefs, J. M., and Dautzenberg, F. M. (2008). Nociceptive and behavioural sensitisation by protein kinase Cepsilon signalling in the CNS. *J Neurochem* **104**, 1-13.
- Veenema, A. H., Bredewold, R., and Neumann, I. D. (2007). Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* **32**, 437-450.
- Venerosi, A., Calamandrei, G., and Ricceri, L. (2006). A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicol Teratol* **28**, 466-471.
- Venerosi, A., Cutuli, D., Colonnello, V., Cardona, D., Ricceri, L., and Calamandrei, G. (2008). Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicol Teratol* **30**, 468-474.
- Verma, S. K., Raheja, G., and Gill, K. D. (2009). Role of muscarinic signal transduction and CREB phosphorylation in dichlorvos-induced memory deficits in rats: an acetylcholine independent mechanism. *Toxicology* **256**, 175-182.
- Veronesi, B., and Pope, C. (1990). The neurotoxicity of parathion-induced acetylcholinesterase inhibition in neonatal rats. *Neurotoxicology* **11**, 465-482.
- Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Walz, R., Medina, J. H., and Izquierdo, I. (2000). Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc* **72**, 353-364.
- Voci, V. E., and Carlson, N. R. (1973). Enhancement of maternal behavior and nest building following systemic and diencephalic administration of prolactin and progesterone in the mouse. *J Comp Physiol Psychol* **83**, 388-393.
- Volk, B. (1984). Cerebellar histogenesis and synaptic maturation following pre- and postnatal alcohol administration. An electron-microscopic investigation of the rat cerebellar cortex. *Acta Neuropathol* **63**, 57-65.
- Vyas, A., Bernal, S., and Chattarji, S. (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res* **965**, 290-294.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B. S., and Chattarji, S. (2002). Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* **22**, 6810-6818.
- Walf, A. A., Koonce, C. J., and Frye, C. A. (2008). Estradiol or diarylpropionitrile decrease anxiety-like behavior of wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice. *Behav Neurosci* **122**, 974-981.
- Watson, W. E. (1974). Physiology of neuroglia. *Physiol Rev* **54**, 245-271.

- Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby, A. G., Augustijn-Beckers, P. W., and Burt, J. P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol* **123**, 1-155.
- Weikert, T., Rathjen, F. G., and Layer, P. G. (1990). Developmental maps of acetylcholinesterase and G4-antigen of the early chicken brain: long-distance tracts originate from AChE-producing cell bodies. *J Neurobiol* **21**, 482-498.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 553-561.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Druse, M., Walker, P., and Lauder, J. M. (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res* **73**, 19-29.
- Whitaker-Azmitia, P. M., Lauder, J. M., Shemmer, A., and Azmitia, E. C. (1987). Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptors. *Brain Res* **430**, 285-289.
- Whitney, K. D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (1995). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* **134**, 53-62.
- Wiggins, R. C. (1986). Myelination: a critical stage in development. *Neurotoxicology* **7**, 103-120.
- Wilhelm, K., Parker, G., Geerligs, L., and Wedgwood, L. (2008). Women and depression: a 30 year learning curve. *Aust N Z J Psychiatry* **42**, 3-12.
- Windebank, A. J. (1986). Specific inhibition of myelination by lead in vitro; comparison with arsenic, thallium, and mercury. *Exp Neurol* **94**, 203-212.
- Yanai, J., Vatury, O., and Slotkin, T. A. (2002). Cell signaling as a target and underlying mechanism for neurobehavioral teratogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **965**, 473-478.
- Yang, D., Howard, A., Bruun, D., Ajua-Alemanj, M., Pickart, C., and Lein, P. J. (2008). Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon inhibit axonal growth by interfering with the morphogenic activity of acetylcholinesterase. *Toxicol Appl Pharmacol* **228**, 32-41.
- Young, J. G., Eskenazi, B., Gladstone, E. A., Bradman, A., Pedersen, L., Johnson, C., Barr, D. B., Furlong, C. E., and Holland, N. T. (2005). Association between in utero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology* **26**, 199-209.
- Young, R., and Johnson, D. N. (1991). Comparison of routes of administration and time course effects of zacopride and buspirone in mice using an automated light/dark test. *Pharmacol Biochem Behav* **40**, 733-737.
- Zanoli, P., Truzzi, C., Veneri, C., Braghiroli, D., and Baraldi, M. (1994). Methyl mercury during late gestation affects temporarily the development of cortical muscarinic receptors in rat offspring. *Pharmacol Toxicol* **75**, 261-264.
- Zheng, Q., Olivier, K., Won, Y. K., and Pope, C. N. (2000). Comparative cholinergic neurotoxicity of oral chlorpyrifos exposures in preweanling and adult rats. *Toxicol Sci* **55**, 124-132.
- Zoeller, R. T., Butnariu, O. V., Fletcher, D. L., and Riley, E. P. (1994). Limited postnatal ethanol exposure permanently alters the expression of mRNAs encoding myelin basic protein and myelin-associated glycoprotein in cerebellum. *Alcohol Clin Exp Res* **18**, 909-916.