Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)
OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID : 19422

To cite this version :
Loyant, Louise. *Neurotoxicite développementale du chlorpyrifos via le système endocannabinoïde : effets comportementaux chez le rat.* Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 112 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE

Université de Toulouse

ANNEE 2017 THESE : 2017 – TOU 3 – 4040

NEUROTOXICITE DEVELOPPEMENTALE DU CHLORPYRIFOS VIA LE SYSTEME ENDOCANNABINOÏDE : EFFETS COMPORTEMENTAUX CHEZ LE RAT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

LOYANT, Louise
Née, le 21/05/1991 à CERET (66)

Directeur de thèse : Mme Martine CLAUW

JURY

PRESIDENT :
M. Jean PARINAUD Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :
Mme Martine CLAUW Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Mme Véronique GAYRARD Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE

Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M **DELVERDIER Maxence,** *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **SCHELCHER François,** *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechnie*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
Mme **HAGEN-PICARD**, Nicole, *Pathologie de la reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **MEYER Gilles,** *Pathologie des ruminants*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud,** *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle,** *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent,** *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

Remerciements au Jury

A Monsieur le Professeur Jean PARINAUD, Président du jury.

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Biologie du développement et de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire de Purpan.

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Martine KOLF-CLAUW Directrice de la Thèse.

Professeur de Pharmacie-Toxicologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
Pour son intérêt et son soutien, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse entre deux continents.

A Madame le Professeur Véronique GAYRARD, Assesseur.
Professeur de Physiologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
Pour avoir accepté d'être assesseur de ma thèse, pour votre disponibilité et votre soutien. Sincère reconnaissance.

Table des matières

Table des illustrations…….....7
Table des annexes……..….....9
Liste des abréviations…….....10
Introduction…….……...12

I. 1ère PARTIE: Le chlorpyrifos, insecticide neurotoxique et l'évaluation du risque sanitaire

A. Exposition de la population générale au chlorpyrifos 13
1. Présentation générale du pesticide chlorpyrifos 13
2. Exposition de la population au pesticide chlorpyrifos..... 13
2.1. Utilisation du chlorpyrifos à travers le monde 14
a. Le chlorpyrifos, un organophosphoré utilisé à grande échelle aux Etats-Unis . 14
b. Le chlorpyrifos, un pesticide très répandu en Europe en agriculture..... 15
c. Le chlorpyrifos, un pesticide largement utilisé, particulièrement en France en agriculture…….….15
2.2. Exposition au chlorpyrifos : distribution et persistance dans l'environnement .. 15
a. Persistance du chlorpyrifos et de ses métabolites dans le sol, l'air et l'eau 16
b. Biotransformation du chlorpyrifos et de ses métabolites dans l'environnement 16
c. Persistance du chlorpyrifos à l'intérieur des maisons 16
2.3. Contexte d'exposition au chlorpyrifos 17
a. Ancien usage domestique du chlorpyrifos..... 17
b. Contexte d'exposition actuel au chlorpyrifos..... 18
i. Exposition agricole au chlorpyrifos……..….....18
ii. Contexte d'exposition domestique et résidentiel, les enfants, une population à risque…….....18
c. Les enfants des communautés agricoles, la population la plus exposée…...….19

B. Le chlorpyrifos face à l'organisme, la toxicocinétique 19
1. Voies d'expositions au chlorpyrifos : l'absorption 20

1.1. Biomarqueurs d'exposition au chlorpyrifos 20
1.2. Toxicocinétique du chlorpyrifos : l'absorption 20
a. L'absorption orale du chlorpyrifos : 20
i. Chez les rongeurs de laboratoire……...21
ii. Absorption orale chez l'Homme…….....22
b. Absorption par voie cutanée du chlorpyrifos 23
i. Chez les animaux de laboratoire :……....23
ii. Chez l'Homme:…….…..23
c. Absorption par inhalation du chlorpyrifos……..……...24
i. Chez les animaux…….....24
ii. Chez l'Homme :…….....25
2. Toxicocinétique du chlorpyrifos : la distribution..... 25
2.1. Etudes de la distribution chez les animaux de laboratoire : 25
2.2. Etude de la distribution chez l'Homme: 26
3. Toxicocinétique du chlorpyrifos : le métabolisme..... 26
3.1. Les différentes étapes du métabolisme du chlorpyrifos 27
a. La désulfuration du chlorpyrifos et la formation du chlorpyrifos-oxon:..... 27
b. L'hydrolyse du chlorpyrifos-oxon et la formation du TCPy 28
c. La déarylation ou l'hydrolyse du chlorpyrifos en TCPy 28
d. Conjugaison au glutathion du TCPy 28
e. Conjugaison à l'acide glucoronique et au sulfate du TCPy..... 28
3.2. Spécificité des marqueurs. 29
3.3. Différences interindividuelles de métabolisme du chlorpyrifos 29
a. Différences liées au stade développemental 29
b. Différences génétiques et d'expression de PON1 30
4. Toxico-cinétique du chlorpyrifos : l'élimination 31

C. Processus pathophysiologiques du chlorpyrifos 31
1. L'acétylcholinestérase et la toxicité aigüe 31
1.1. L'acétylcholine dans le système nerveux 32
1.2. Inhibition de l'acétylcholinestérase par le chlorpyrifos 32
1.3. La toxicité du chlorpyrifos au niveau moléculaire..... 32
1.4. Caractérisation de la toxicité aigüe, le DL50 du chlorpyrifos..... 33

2. Les différents syndromes provoqués par le chlorpyrifos 34
2.1. Le syndrome cholinergique 34
2.2. Le syndrome intermédiaire 34
2.3. La neurotoxicité retardée 34
3. Effets non neurotoxiques du chlorpyrifos 35

D. Evaluation des risques sanitaires du chlorpyrifos pour la population générale: .. 35
1. Réglementation générale concernant le chlorpyrifos 36
1.1. Evaluation des risques et limites réglementaires……..……..……..…36
1.2. Nouvelles limites réglementaires……..……...37
2. Poids de la preuve 38
2.1. Le chlorpyrifos danger ou risque pour la santé dans la population générale?..... 38
2.2. Etudes épidémiologiques 39
a. Enquêtes épidémiologiques et biomarqueurs utilisés 39
b. Extrapolation à l'exposition de la population humaine générale…….....40
2.3. Cas particulier des enfants 41

II. 2ème PARTIE: Neurotoxicité comportementale du chlorpyridos : étude expérimentale

A. Neurotoxicite developpementale du chlorpyrifos : contexte de l'étude expérimentale……..42
1. Le développement du cerveau se poursuit jusqu'à l'adolescence 42
1.1. L'adolescence chez le rat 42
1.2. Le développement du cerveau chez l'Homme 43
1.3. Comparaison relative des âges rats/Homme 43
2. La neuroplasticité du cerveau en développement 44
2.1. Les étapes du développement du cerveau 44
2.2. Le développement du cerveau, une période de vulnérabilité 45
3. La neurotoxicité développementale du chlorpyrifos à plusieurs échelles 46
3.1. Neurotoxicité à l'échelle cellulaire 46
3.2. Neurotoxicité comportementale du chlorpyrifos 47
a. Neurotoxicité comportementale chez l'homme : 47

b. Neurotoxicité comportementale du chlorpyrifos chez les rongeurs 49
i. Altération de l'apprentissage et de la mémoire chez les rats……..49
ii. Altération de l'anxiété chez les rats……..…….49
4. Des mécanismes encore inconnus lors d'une exposition chronique à faible dose 50
5. Une cible privilégiée du chlorpyrifos, le système endocannabinoïde : 51
5.1. Présentation du système endocannabinoïde…….....51
a. Les endocannabinoïdes et leurs récepteurs..... 51
b. Les enzymes de métabolisme des endocannabinoïdes..... 52
5.2. Le rôle de signalisation des endocannabinoides…….……....52
a. Rôle des endocannabinoïdes à l'échelle cellulaire 52
b. Rôle des endocannabinoïdes dans la transmission de l'information neuronale53
c. Rôle des endocannabinoïdes dans le développement du cerveau 54
6. Rôle des endocannabinoïdes sur le comportement 54
6.1. Régulation de l'émotivité par les endocannabinoïdes 54
a. Définition de l'émotion et de l'émotivité 54
b. Rôle des endocannabinoïdes dans l'émotivité et l'anxiété 55
c. Effets anxyolitiques des endocannabinoïdes 56
i. Délétion génétique des récepteurs CB1……...56
ii. Effets des agonistes et antagonistes au récepteur CB1 sur le comportement émotif…….57
iii.Effets de l'augmentation du signal de l'anandamine à travers l'inhibition de la FAAH…….…..57
iv. Effets de l'inhibition de la FAAH sur le modèle de l'anxiété……....58
d. Résultats contradictoires et effets des stimuli environnementaux sur l'inhibition de la FAAH..... 58
6.2 Régulation du comportement social et du jeu par les endocannabinoïdes 59
a. Observations du comportement social : le jeu……..61
b. Substrats neuronaux du comportement social : le jeu……..…..63
c. La régulation du comportement social par les endocannabinoïdes……..63
7. Altération du système des endocannabinoïdes par le chlorpyrifos.....62

B. Objectifs de l'étude expérimentale 63
1. Résultats préliminaires antérieurs à l'étude 64

2. Etude de l'émotivité et de l'anxiété au travers de nouveaux tests comportementaux 65

C. MATERIELS ET METHODES 66

1. Produits chimiques utilisés: 66
2. Animaux: 66
3. Exposition 66
4. Tests comportementaux : 67
   4.1. Le champ ouvert de l'étude (PND 23)……..……....67
   4.2. Le labyrinthe en croix surélevé de l'étude (PND29)……..……68
   4.3. Test du comportement social de notre étude (PND 35-36)……...69
5. Analyses statistiques 70
6. Matériel et méthode des analyses biochimiques :..... .70
   6.1. Niveau de corticostérone dans le sérum 70
   6.2. Dissection du prosencéphale 71
   6.3. Analyses biochimiques de régions spécifiques du cerveau 71

D. RESULTATS DES TESTS COMPORTEMENTAUX 72

1. Résultats du contrôle de la toxicité et du poids des rats 72
   1.1. L'« open field » (PND23) … ……..……..74
   1.2.Labyrinthe en croix surélevé (PN29): 74
2. Mesure du comportement social (PND 35): 78

E. DISCUSSION 79

1. L' « open field »:..... 79
2. Le labyrinthe en croix surélevé : 81
   2.1. Le labyrinthe en croix surélevé et la mesure de l'émotivité et de l'anxiété 81
   2.2. Discussion des résultats du labyrinthe en croix surélevé 82
   2.3. Introduction des facteurs éthologiques 82
3. Le test du comportement social 83
   3.1. Mesure de l'anxiété au travers des interactions sociales 83
   3.2. Discussion des résultats du test des interactions sociales 84
4. Résultats similaires dans la littérature 84

F. Conclusion de l'étude expérimentale……..86

G. Perspectives de l'étude expérimentale : 86

Conclusion générale…….……...….....88

Bibliographie……..…….....90

Annexes…….....107

Table des illustrations

SCHEMAS :

Fig. 1 : Représentation chimique des molécules de chlorpyrifos-éthyl et de chlorpyrifos-méthyl……...……..……..13

Fig.2: Etapes de biotransformation du chlorpyrifos …….....27

Fig. 3: L'inhibiteur de l'acétylcholinestérase empêche la liaison du ligand l'acétylcholine...33

Fig. 4 : Comparaison relative entre l'âge d'un rat et le stade développemental du cerveau humain.....44

Fig. 5 : Résumé des processus ayant lieu durant le développement du cortex préfrontal de rat…….….....45

Fig.7 : Les endocannabinoides et leurs enzymes de dégradation……..….....52

GRAPHIQUES :

Fig. 6: Latence à sortir du compartiment sombre dans le test comportemental de préférence lumière/ obscurité chez de rats traités a avec de l'huile de maïs (contrôles), 0,5mg/kg, 0,75mg/kg et 1mgkg de chlorpyrifos du PND 10 au PND 16……...……...……50

Fig. 8 : Résultats comportementaux des rats : après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 au jour postnatal 16 avec l'huile de maïs (control) ou 0,5, 0,75,1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0,02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH.

- **Fig.8 Exp.1**: Gain de poids après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 jusqu'au jour 16…….....72
- **Fig.8 Exp.2 :** Nombre total de traversées de lignes (A), distance parcourue (B), traversée dans la zone.75 centrale(C), et temps passé dans la zone centrale (D) dans un « open field », testé sur des rats en jour post natal 23…….……73
- **Fig.8 Exp.3** : Nombre d'entrées dans le bras ouvert (A), temps passé dans le bras ouvert) (B), nombre d'entrées dans le bras ouvert (% du nombre d'entrées total) (C) et temps passé dans le bras ouvert (% temps total) (D) dans un labyrinthe en croix surélevé au jour postnatal 29……...…74
- **Fig. 8 Exp.4** : Temps passé dans le bras fermé (A), nombre d'entrées dans le bras fermé(B), nombre total d'entrées (C), nombre de traversées de la zone centrale (D)

dans un labyrinthe en croix surélevé au jour postnatal 29. …….....75

- **Fig. 8 Exp.5** : Tentatives d'entrées dans le bras ouvert (A), fréquence de « museau dans le bras ouvert » (B), dans un labyrinthe en croix surélevé au jour postnatal 29…….....77

- **Fig. 8 Exp.6** : Fréquence de poursuites (A), fréquences de passage en dessus/dessous (B), fréquences de jeu de combat (C), temps passe à jouer (D) pendant le test d'interactions sociales au jour post natal 35….……..…..78

Table des annexes

SCHEMAS :

Annexe 1. Le métabolisme des deux principaux endocannabinoïdes, 2-arachydonoglycérol et anandamine et voies de transmission cellulaire…….....107

Annexe 2. Métabolisme des endocannabinoïdes au niveau des synapses et voies de transmission cellulaire ……..…….....107

Annexe 3. La différenciation neuronale est contrôlée par les endocannabinoïdes (eCB) agissant sur les récepteurs cannabinoïdes CB1……...……...108

Annexe 4. Modèles animaux et tests expérimentaux liés aux troubles de l'anxiété …….....108

Annexe 6. Répartition des rats nouveaux nés dans les différents groupes de traitement de CPF…….....109

PHOTOGRAPHIES :

Annexe 5. Marquage du dos et de la queue des différents groupes de traitement de rats nouveau-nés……....109

Annexe 7. Test du « champ ouvert » ou « open field » et modélisation de la grille par le logiciel de suivi de locomotion.....…….110

Annexe 8. Labyrinthe en croix surélevé……....110

Annexe 14. Région du cerveau dont l'amygdale est extraite, la région correspondant au tissus collecté pour l'amygdale est entourée sur la coupe transversale…….....112

Annexe 13. Vibratome servant aux coupes de prosencéphale de rat……112

GRAPHIQUES :

Annexe 9. Temps d'initiation de la première interaction en fonction des différents traitements……..111

Annexe 10. Fréquence de toilettage en fonction des différents traitements……..111

Annexe 11. Fréquence de reniflement de la région péri-anale en fonction des différents traitements……..111

Annexe 12. Fréquence d « attaque de la nuque » en fonction des différents traitements….111

Liste des abréviations

Par ordre alphabétique :

- 2-AG : 2-arachidonoglycérol
- AchE: acétylcholinestérase
- ADHD : attention deficit hyperactivity disorder, trouble de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité
- ADI: « acceptable daily intake », dose journalière acceptable
- AEA : anandamine
- Anses: L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- ARfD : « acute referance dose », dose aigue de référence
- BuChE : butylecholinestérase
- CB1R: récepteur aux endocannabinoïdes CB1
- CB2R: récepteur aux endocannabinoïdes CB2
- CPF : chlorpyrifos
- CPF-oxon : chlorpyrifos-oxon
- CSST : commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail
- DAP : dialkyl phosphate
- DJA : dose journalière acceptable
- DEP : diétyle phosphate
- DETP : diétyle thiophosphate
- DL50: dose létale 50
- EC : endocannabinoïde
- EFSA : european food safety authority, autorité européenne de securité des aliments
- EPA: «united states environmental protection agency», agence américaine pour la protection de l'environnement
- FAAH : fatty acide amine hydrolase, hydrolase des amides d'acides gras
- IDM : index de développement mental
- IDP : index de développement psychomoteur
- INERIS : L'institut national de l'environnement industriel et des risques
- INSERM : institut national de la santé et de la recherche médicale

- JMPR : « joint meeting on pesticide residues », assemblée sur les résidus de pesticides
- LMR : limite maximale de résidus
- MAGL : mono acyle glycérol lipase
- NOAEL: « no observed adverse effect level», dose sans effet nocif observé
- OP : organophosphorés
- PND: «post-natal day», jour post-natal
- PON1: paraoxonase 1
- TCPy : 3,5,6-trichloro-2- pyridinol
- USGS: «united states ecological survey», institut d'études géologiques des États-Unis
- VTR: valeur toxicologique de référence

INTRODUCTION

La neurotoxicité développementale du chlorpyrifos (CPF) lors d'une exposition, à faible dose, sur le long terme, est l'objet de ce travail. Cette toxicité a été jugée très inquiétante chez les enfants, avec notamment des effets sur le long terme, comme des altérations du développement de leur cerveau et de leur comportement. Il est donc particulièrement intéressant de savoir pourquoi les enfants constituent la population la plus vulnérable face à cette toxicité. Quel est le mécanisme de cette neurotoxicité ? Peut-on extrapoler aux enfants des résultats obtenus grâce à des enquêtes épidémiologiques ou des études sur le modèle animal? Le risque pour les enfants est-il réel ?

Cette thèse est organisée autour de deux grandes parties. Une première partie, bibliographique, cherchant à comprendre pourquoi les enfants constituent la population la plus à risque face au CPF. Comment cette sous-population est exposée au CPF et pourquoi elle est plus exposée que les adultes. Il est également abordé la toxicocinétique du CPF, avec successivement l'absorption, la distribution le métabolisme et élimination de ce toxique par l'organisme. Enfin, l'évaluation des risques sanitaires, dans la population et particulièrement chez les enfants, suite à l'exposition au CPF sera étudiée. Peut-on extrapoler l'exposition d'un rat au CPF à l'exposition d'un enfant ? Peut-on parler de réel risque pour la santé des enfants ?

Une seconde partie expérimentale sera ensuite présentée, cherchant à comprendre le mécanisme des effets du CPF sur le comportement dans un modèle animal. Quels sont les processus physiopathologiques impliqués dans la toxicité du CPF ? Pourquoi son effet neurotoxique est plus important chez les enfants et quels sont ses effets sur le long terme, notamment sur le développement du cerveau et le comportement des enfants ? Pourquoi le mécanisme de toxicité le plus connu, via l'altération du système cholinergique est remis en question? Le mécanisme de toxicité impliquant le système des endocannabinoïdes, lors d'une exposition à faible dose est-il étayé ? Existe-t-il des altérations comportementales chez les rats comparables à celles retrouvées chez les enfants suite à l'exposition au pesticide ?

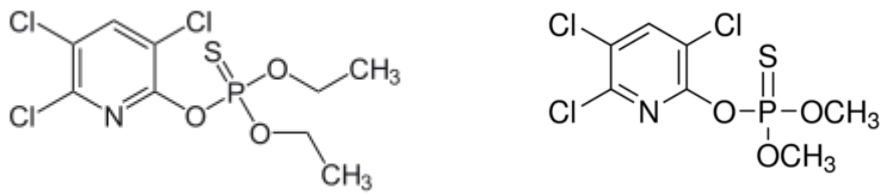
I. 1ère PARTIE : Le chlorpyrifos, insecticide neurotoxique et l'évaluation du risque sanitaire

Le chlorpyrifos est un pesticide organophosphoré qui, à faible dose, est suspecté d'avoir des effets négatifs, au long terme, sur le développement du cerveau et sur le comportement.

A. Exposition de la population générale au chlorpyrifos

1. Présentation générale du pesticide chlorpyrifos

Le chlorpyrifos (diethoxy-sulfanylidene-(3, 5,6-trichloropyridin-2-yl) oxyphosphorane), fait partie de la famille des pesticides organophosphorés. Cette substance est très peu soluble dans l'eau mais soluble dans la plupart des solvants organiques. Le chlorpyrifos est présent sur le marché comme composant actif de nombreuses présentations phytosanitaires : poudre, granulés, suspension micro-encapsulées et gel (Eaton, 2008). On distingue le chlorpyrifos-méthyl et le chlopyrifos-éthyl (INERIS, 2006) (**Fig. 1**).



chlorpyrifos-éthyl chlorpyrifos-méthyl

Fig. 1 : Représentation chimique des molécules de chlorpyrifos-éthyl et de chlorpyrifos-méthyl.

Lorsqu'on utilise l'appellation générale chlorpyrifos c'est la forme éthyl qui est étudiée (*O*, *O*-diethyl *O*-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate), ce qui sera le cas pour le reste de l'étude et on le notera CPF.

a. Exposition de la population au pesticide chlorpyrifos

Pour qu'un individu soit intoxiqué au chlorpyrifos plusieurs étapes sont nécessaires entre l'émission du pesticide et l'apparition de sa toxicité. La première étape est la diffusion de chlorpyrifos dans l'environnement, où il va subir plusieurs transformations, avant d'atteindre sa cible, la population humaine. Celle-ci va être

alors être exposée au pesticide. Sa toxico-cinétique va permettre de décrire le devenir du chlorpyrifos dans l'organisme et comment celui-ci va produire ses effets toxiques.

2.1. Utilisation du chlorpyrifos à travers le monde

Il est important de connaître quelle est la source du chlorpyrifos pour comprendre comment la population générale, et particulièrement les enfants, peuvent y être exposés. Pour le chlorpyrifos la source d'exposition est anthropogénique via son usage résidentiel, domestique et agricole. Son utilisation est très répandue aux Etats-Unis, en Europe et en France.

a. Le Chlorpyrifos, un organophosphoré utilisé à grande échelle aux Etats-Unis

Les insecticides organophosphorés (OP) et particulièrement le CPF font partie des insecticides les plus fréquemment utilisés aux Etats-Unis. Les OP représentent plus de 50% de tous les pesticides utilisés dans le monde (Casida, 2004). Ils comptent pour environ 35% des pesticides vendus aux Etats-Unis. Par exemple, en 2007, 15 000 tonnes de pesticides organophosphorés ont été utilisés dans ce pays, soit 36% de son utilisation à l'échelle mondiale (Grube, 2011). L'un des OP le plus commun est le chlorpyrifos (CPF). Ce pesticide a été mis sur le marché par *Dow Chemical* en 1965 comme une alternative au pesticide controversé, le DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane). La consommation du CPF été estimée à 2 000 tonnes par an aux Etats-Unis. Les agriculteurs en utilisent trois fois plus que les autres pesticides organophosphorés (USGS, 2016). Ce pesticide a été massivement utilisé à l'intérieur des maisons comme insecticide (contre les cafards, les puces, les termites, les mouches…), parfois comme composant des colliers anti-puces et tiques chez les animaux de compagnie et comme anti-tiques chez le bétail dans les fermes (Eaton, 2008). Cependant, sa forme commerciale résidentielle (Lorsban et Dursban), a été interdite aux Etats-Unis le 31 décembre 2000 (U.S., EPA, 2016). Pourtant, le CPF est toujours utilisé en agriculture. Il est enregistré sur une douzaine de cultures différentes dont 39% de son utilisation sur le maïs, 15% sur les arachides, 9% sur le soja et 10% sur les arbres fruitiers. L'usage non lié à l'agriculture compte pour 3% des applications totales et est limité aux pulvérisations anti-moustiques à grande échelle, (27 000kg/an en 2006), et sur les parcours de golf (70 000 kg/an en 2006) (U.S, EPA, 2016 ; Eaton, 2008). Selon l'EPA (U.S. Environnemental Protection

Agency), il existe 400 produits différents du commerce qui contiennent le chlorpyrifos comme ingrédient actif.

b. Le chlorpyrifos, un pesticide très répandu en Europe en agriculture

L'Europe fait partie des plus gros consommateurs dans le monde de pesticides organophosphorés et particulièrement de CPF. Les organophosphorés sont fréquemment utilisés en Europe en agriculture comme pesticide car ils ont un large spectre d'action et sont bon marché. En 2003, ils ont représenté 59% (4645 tonnes) des ventes d'insecticide en Europe, et le CPF est le pesticide le plus vendu (15,6% de tous les pesticides soit 1226 tonnes) (Saunders, 2012).

c. Le chlorpyrifos, un pesticide largement utilisé, particulièrement en France en agriculture

La France est l'un des premiers utilisateurs mondiaux de pesticides. Ses ventes sont comprises entre 80 000 et 100 000 tonnes par an. Pour la période 2001-2003, la densité moyenne d'usage des pesticides a été de 2,9kg de substance active à l'hectare de SAU (surface agricole utile). Cette densité se situe dans la moyenne européenne, et est supérieure à celle des Etats-Unis. La vente du pesticide organophosphoré, CPF est estimée à une centaine de tonnes par an en France (INSERM, 2013). L'usage domestique du Chlorpyrifos a été interdit en 1995 en France, cependant il est toujours utilisé en agriculture comme insecticide pour le traitement des parties aériennes, des semences, des sols, des locaux de stockage et des bâtiments d'élevage. Cette substance est utilisée sur divers végétaux contre les pucerons et chenilles dans les plantations de blé, de colza, dans les vignes ou encore dans les cultures légumières (pommes de terre, navets) et fruitières (pommiers, poiriers, pêchers) (INERIS, 2006). Les produits à base de CPF les plus largement utilisés en France sont : le Pyrinex ME®, le Nurelle D 220®, le Nurelle D 550® et le Pyrist®.

2.2. Exposition au chlorpyrifos : distribution et persistance dans l'environnement

Suite à son utilisation le chlorpyrifos se retrouve alors dans l'environnement : dans le sol, l'eau, l'air et la nourriture. Il va y être dispersé et transformé. Son usage domestique

est interdit en France depuis plus de vingt ans. A noter, cependant, qu'il peut persister à l'intérieur des maisons.

a. Persistance du chlorpyrifos et de ses métabolites dans le sol, l'air et l'eau

Après sa pulvérisation sur les cultures, le CPF et ses métabolites vont rapidement se lier aux particules des plantes et du sol. Les enfants jouant en contact avec de la terre, par exemple, sont donc susceptibles d'y être exposés. Dans le sol, le CPF est dégradé avec un temps de demi-vie estimé à 35 jours (INERIS, 2006). Dans l'air, sa pression de vapeur est assez basse (1.9×10^{-5} mm Hg à 25◦C), il est donc rapidement volatilisé dans l'atmosphère, son temps de demi-vie y est estimé à 2 jours. L'air n'est donc pas une source de dissémination majeure (INERIS, 2006). Dans l'eau, il est peu soluble, donc il très rarement identifié dans l'eau de boisson ou souterraine (INERIS, 2006). S'il entre en contact avec une source d'eau, il va rapidement se volatiliser depuis la surface. Les métabolites du CPF peuvent persister sur de longues périodes, dans certaines conditions environnementales. Ils ont un temps de demi-vie d'environ 3 jours à l'extérieur. Le climat va impacter la persistance du CPF et de ses métabolites dans l'environnement et particulièrement sur les fruits et légumes. En effet, la dissipation est plus rapide dans les pays aux climats tropicaux et plus lente dans les climats tempérés et où la nourriture est cultivée en hiver (Chai, 2009).

b. Biotransformation du chlorpyrifos et de ses métabolites dans l'environnement

Le CPF subi des biotransformations dans l'environnement. En entrant dans l'eau, la dégradation du CPF et de ses métabolites est associée avec une hydrolyse abiotique (sans organismes vivants) et/ou à une oxydation photosensible. Dans le sol, la photo-dégradation joue un rôle dans l'hydrolyse, la déchlorination et l'oxydation du CPF.

c. Persistance du chlorpyrifos à l'intérieur des maisons

Par ailleurs, à l'intérieur des habitations, le CPF peut persister pendant plusieurs mois, voire années. Les enfants sont ainsi toujours susceptibles d'être exposés, à de très faibles doses dans les maisons. Cette persistance est due au manque de lumière, d'eau et de micro-organismes qui contribuent à sa dégradation normale à l'extérieur (Eaton, 2008). Ainsi il a été retrouvé dans 78% des maisons américaines, choisies de manière aléatoire, des

concentrations mesurables de CPF (Stout, 2009). De plus, il a été détecté, chez une cohorte d'habitants de New York, des concentrations de CPF conséquentes chez 99,7% des échantillons d'air intérieur des habitations (Whyatt, 2003). Le CPF est donc encore bien présent dans l'environnement urbain.

2.3. Contexte d'exposition au chlorpyrifos

L'organisme doit être exposé au chlorpyrifos pour qu'un effet toxique se manifeste. L'exposition au chlorpyrifos peut être professionnelle, domestique ou via l'environnement résidentiel. L'exposition dépend de sa fréquence d'utilisation et de l'intensité du contact mais également du comportement des individus de la population : la profession, le régime alimentaire, l'utilisation de pesticides, l'environnement de résidence... La voie principale d'exposition découle de son utilisation en agriculture chez les professionnels et dans les zones résidentielles rurales. Les enfants font partie de la population la plus exposée via leur environnement à cause de leurs caractéristiques intrinsèques.

a. Ancien usage domestique du chlorpyrifos

Autrefois, lorsque l'utilisation résidentielle du CPF était autorisée, il a été constaté plusieurs cas d'empoisonnement. Par exemple, des employés d'une école ont été intoxiqués, après être entrés dans des locaux, venant d'être traités contre les cafards trois jours avant. Il a fallu attendre 14 jours pour que le niveau de CPF dans l'air ambiant revienne à un niveau normal et que les élèves puissent être réadmis (Sesline, 1994). Un autre cas a été celui d'un enfant suspecté d'avoir été empoisonné par le pesticide. Il souffrait d'un arrêt respiratoire et un test sanguin a montré une inhibition de son acétylcholinestérase sanguine de 50% par rapport à son activité normale (l'acétylcholinestérase est le marqueur de toxicité du CPF). La maison où habitait l'enfant avait été précédemment traitée au CPF et la substance avait été retrouvée sur les torchons, les surfaces de préparation de la nourriture et les habits de l'enfant (Dunphy, 1980). Autrefois également la substance persistait sur la fourrure des animaux domestiques, après un traitement anti-puces, les enfants étaient exposés en jouant avec les animaux (Ames, 1989). L'exposition durant la grossesse a été, de même, très problématique, car un fort pourcentage de femmes enceintes utilisait ce pesticide chez elles durant leur grossesse (Whyatt, 2001).

b. Contexte d'exposition actuel au chlorpyrifos

i. Exposition agricole au chlorpyrifos

Suite à l'interdiction de l'usage résidentiel et domestique du CPF, l'agriculture reste la source d'exposition majeure pour ce pesticide. Les enfants des communautés agricoles ou vivants près de cultures y sont très exposés. Le CPF est donc essentiellement retrouvé sous forme de résidus dans l'alimentation, dans les habitations sur ou proches de terres agricoles et chez des employés agricoles exposés sur leur lieu de travail. Ces employés peuvent être des agriculteurs ou des intermittents en charge de la pulvérisation d'insecticides dans les fermes ou les serres (Eaton, 2008). Néanmoins, la plus forte exposition au CPF se fait pendant son usage professionnel, particulièrement les étapes de transport, de stockage, de préparation, d'épandage, de nettoyage des réservoirs… Les employés de manufactures de chlorpyrifos sont également très exposés, en particulier en cas de fuite.

ii. Contexte d'exposition domestique et résidentiel, les enfants, une population à risque

La population générale, et particulièrement les enfants subissent une exposition résidentielle et domestique. Dans le passé, l'utilisation du CPF à l'intérieur des maisons a amené sa persistance dans l'environnement intérieur actuel, notamment sur le sol et toutes les surfaces. De plus, il peut y avoir des transferts entre les différents contextes, par exemple les parents travaillant dans une ferme peuvent transférer les résidus à leurs enfants à la maison via leurs vêtements notamment. Il existe également une dissémination des pesticides par le vent (« la dérive des pesticides »), entre les terres agricoles et les zones résidentielles attenantes. Par ailleurs, les enfants constituent une population vulnérable méritant une attention particulière car ils présentent des caractéristiques spécifiques aggravant leur niveau d'exposition. A savoir, leur prise journalière de nourriture, d'eau et leur inhalation d'air sont plus importantes par rapport à leur masse corporelle lorsqu'on les compare aux adultes. De plus, ils ont un comportement main-bouche augmentant cette exposition aux pesticides qui peuvent être présents dans l'eau, le sol et les poussières (l'ANSES, 2013, INSERM 2016). Les enfants jouant sur le sol ou dans les jardins et portant les objets à leur bouche sont particulièrement exposés par voie dermique et orale.

c. Les enfants des communautés agricoles, une population la plus exposée

Les enfants des communautés agricoles aux Etats-Unis sont les plus exposés selon plusieurs études épidémiologiques. En effet, les enfants inclus dans l'étude de Koch en 2002, présentent une concentration en métabolites des pesticides organophosphorés plus élevée les mois correspondant à l'épandage de pesticides sur les champs (Koch, 2002). Ces métabolites ont également été retrouvés chez les femmes enceintes et les enfants de ces communautés agricoles. Il a notamment été retrouvé le métabolite du CPF, le 3,5,6-trichloro-2- pyridinol (TCP_y) dans l'urine de 83,3% de 60 enfants vivants dans des communautés agricoles en Caroline du Nord-est. 54 enfants avaient deux ou plusieurs métabolites de pesticides dans leurs urines et 9 enfants avaient 6 métabolites de pesticides différents. Les voies d'exposition supposées dans cet article sont : les vêtements des employés agricoles qui ramènent des résidus chez eux, une voie environnementale, où les pesticides sont appliqués sur des cultures avoisinantes et les vents qui les ramènent vers les habitations. Il a par ailleurs été démontré que les employés agricoles ont peu de connaissances des pesticides qu'ils utilisent et qu'ils ne reçoivent pas l'information nécessaire à ce sujet (Arcury, 2007). Dans une autre étude, les concentrations résiduelles de pesticides dans l'air, les poussières et la pelouse d'écoles ont été suivies, à proximité de vignobles en Afrique du Sud (Dalvie, 2014). Il a été démontré que 6 des 11 pesticides détectés dans les échantillons d'urine des écoles figurent dans le planning de pulvérisation des exploitations, la dérive des pesticides par le vent est mise en cause. Une seconde étude (Morgan, 2013) a mesuré la concentration de résidus de pesticides dans les urines de 135 enfants, âgés de deux à cinq ans, après la consommation de jus de fruits frais, céréales, légumes et pain aux Etats-Unis (Caroline du Nord et Ohio). Le biomarqueur urinaire du CPF a été retrouvé dans 99% des échantillons d'urine des enfants.

B. Le chlorpyrifos face à l'organisme, la toxicocinétique

L'exposition au chlorpyrifos va déclencher des processus physiques et patho-physiologiques dans l'organisme. La dose effective de chlorpyrifos atteignant les tissus et les organes est déterminée par sa toxico-cinétique.

1. Voies d'expositions au chlorpyrifos : l'absorption

L'absorption du chlorpyrifos est le processus de pénétration du pesticide dans l'organisme. Lorsqu'il atteint la circulation sanguine il peut alors exercer sa toxicité systémique. La voie d'exposition principale, non professionnelle, au chlorpyrifos est via l'ingestion d'aliments, majoritairement les fruits et les légumes contenant des résidus. Viennent ensuite des voies secondaires comme la voie cutanée au contact de surfaces contenant du chlorpyrifos et la voie respiratoire.

1.1. Biomarqueurs d'exposition au chlorpyrifos

Les différentes voies d'exposition au CPF ont étaient étudiées à l'aide de biomarqueurs qui sont soit enzymatiques soit des métabolites du CPF. Pour le CPF, les biomarqueurs le plus utilisés sont retrouvés dans les urines et le sang. Dans le sang, l'exposition est déterminée par l'activité de la butylcholinestérase (BuChe) du plasma et par l'activité de l'acétylcholinestérase des érythrocytes (AchE). Dans les urines, on détecte l'excrétion du CPF et de ses métabolites (chlorpyrifos-oxon, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP_y), diéthylphosphate (DEP), diéthylthiophosphate (DETP)), qui vont être abordés par la suite. Le CPF et le CPF-oxon sont les marqueurs les plus spécifiques (Barr, 2006). L'analyse d'urine est le plus souvent pratiquée chez les enfants car moins invasive. Le biomarqueur le plus sensible pour tester l'exposition des fœtus est le méconium lorsque cette sensibilité est comparée à celle des tests pratiqués sur le sang du cordon ombilical (Bielawski, 2005). Quand les tests sur le méconium sont combinés avec d'autres marqueurs comme un échantillon de cheveux de la mère, la sensibilité de détection est encore augmentée (Ostrea, 2009).

1.2. Toxicocinétique du chlorpyrifos : l'absorption

a. L'absorption orale du chlorpyrifos :

La voie principale d'exposition au chlorpyrifos, passée et présente, dans la population générale, est la voie orale par ingestion de boisson ou d'aliments (fruits et légumes principalement) (Saunders, 2012). Il existe une autre voie par ingestion non alimentaire, à cause du comportement exploratoire et d'oralité, « main-bouche », principalement chez les enfants (sol, poussière, objets…) (INSERM, 2013).

i. Chez les rongeurs de laboratoire :

Chez les rongeurs, l'absorption par voie orale de CPF est très importante et rapide. C'est une voie à privilégier lorsque l'on souhaite étudier la toxicité du CPF et avoir une bonne absorption de ce pesticide. La plupart des études d'absorption par voie orale ont été conduites chez le rat, avec l'administration de très fortes doses. A haute dose, l'approche la plus utilisée pour caractériser l'absorption est la corrélation entre les effets sur l'AchE et la dose d'exposition. A des doses relativement basses, reflétant mieux l'exposition humaine, l'absorption in vivo a été communément déterminée par la quantification dans les urines des métabolites du CPF : le TCP_y, le DETP, ou le DEP. Les études portant sur l'absorption du CPF ont calculé le taux d'absorption de ce pesticide et le temps nécessaire pour atteindre le pic maximal de CPF dans le sang. Il a été prouvé que du CPF administré, avec de l'huile de maïs, est bien absorbé (environ 80% d'absorption), et ceci sur plusieurs doses différentes (Timchalk, 2002b). A des doses administrées par voie orale, les pics de concentration des métabolites DEP, DETP et TCP_y ont été trouvés 3h après le traitement. Dans une autre étude, chez des rates en gestation, ce temps a été estimé à 4h post gavage (Mattsson, 2000). Du CPF a été retrouvé chez la mère et le fœtus après l'administration. L'équipe de Timchalk, en 2007, a trouvé un pic de concentration des métabolites 1 à 2h après administration. Par ailleurs, l'équipe de Cometa en 2007, a examiné le métabolisme et les effets sur l'AchE sur des souris après un traitement aigu et répété de CPF. Pour des doses élevées uniques, les effets observables sont l'inhibition de l'AchE dans le sang et dans le cerveau 2h après le traitement avec un pic d'inhibition à 6h. Une autre étude a montré que par absorption orale le CPF-oxon est substantiellement moins efficace pour inhiber l'AchE que le CPF (Cielslak, 1999), cependant in vitro, le CPF-oxon est au moins 1000 fois plus puissant (Cole, 2005). Donc le CPF-oxon semble être dégradé dans l'environnement acide de l'estomac et/ou subir une première phase de dégradation dans les intestins et le foie. Ces résultats montrent l'intérêt du bio-monitoring, pour mesurer le moment adéquat d'analyse des biomarqueurs après absorption orale.

- *Absorption orale chez les rongeurs autour du sevrage*

Les jeunes rats ont une absorption orale du CPF particulièrement importante et rapide. En effet, Timchalk, en 2006, a investigué l'absorption du CPF chez les rats de 5, 12 et 17 jours en utilisant des doses orales de 1 à 10mg/kg de poids corporel. A ces deux doses, il a été observé une absorption et un métabolisme rapide, avec un pic de concentration dans le sang

de CPF et de ses métabolites entre 3 et 6h, à tous âges. La concentration de CPF dans le sang était indépendante de l'âge du rat. La voie orale serait donc à privilégier pour une exposition au CPF résultant en une concentration rapide et importante de CPF dans le sang chez les jeunes rats.

- *Absorption orale chez le fœtus rongeur*

Le fœtus est particulièrement sensible à une exposition par voie orale de sa mère, le placenta n'étant pas une barrière efficace de protection. En effet plusieurs études ont étudié l'absorption du CPF chez le fœtus. Des rates gestantes, traitées quotidiennement avec du CPF (7mg/kg/jour), aux jours de gestation 14 à 18, ont montré des pics similaires en terme d'inhibition de l'AchE dans le cerveau pour les mères et les fœtus (Lassiter, 1999). Ceci démontrant que le CPF peut traverser le placenta jusqu'au fœtus et inhiber l'AchE du cerveau des fœtus. Par ailleurs, Akhtar, en 2006, a investigué le passage trans-placentaire du CPF chez les rates gestantes. Les mères ont été traitées, par voie orale, avec du CPF radioactif. La distribution du CPF chez le fœtus était large (dans le foie, le cerveau, le placenta et le liquide amniotique). Les résidus totaux retrouvés chez le fœtus sont supérieurs à ceux retrouvés chez la mère (4 fois plus de résidus). Le placenta n'est donc pas une barrière très efficace pour empêcher le passage du CPF au fœtus. Hunter, en 1999, a examiné le profil des métabolites dans le fœtus en fin de gestation (14 à 18 jours). Ils ont démontré que la plus haute concentration de TCP_y et la plus grande inhibition de l'AchE a lieu 5h post absorption. La concentration de TCP_y dans le cerveau du fœtus était de 2 à 4 fois plus forte que chez sa mère.

ii. Absorption orale chez l'Homme

Chez les humains, le CPF est relativement bien absorbé par l'intestin et le transfert aux nourrissons par l'allaitement n'a pas encore été suffisamment pris en compte. Nolan en 1984, chez des humains volontaires, a estimé la biodisponibilité du CPF, administré par voir orale, à au moins 70%. En effet, cette quantité a été retrouvée dans les urines après une seule administration. La biodisponibilité réelle pourrait être bien supérieure car une partie de la dose pourrait être éliminé par d'autres voies (la bile, les fèces...) ou retenue dans le corps dans les lipides ou liés à des protéines. Cependant, dans une étude plus récente, Timchalk en 2002, a administré une seule dose de CPF à des humains volontaires également. Du sang et des urines ont été collectés pendant 168h. Ils ont retrouvé seulement entre 20 et 35% de la

dose administrée de CPF sous forme de TCP_y (et non de CPF ou de CPF-oxon) dans les urines, suggérant qu'une dose significative de la dose administrée n'a pas été absorbée. Ils ont expliqué que les différences entre les deux études seraient dues à une différence de formulation et de forme physique. Suite à une exposition accidentelle à dose massive le temps d'apparition des symptômes (confusion, migraine, nausée, vomissements…) apparaissent en moins d'une heure suggérant que l'absorption et la distribution au cerveau sont rapides après une exposition à forte dose (Cochran, 2002). Peu d'études ont étudié la présence de CPF dans le lait d'humain. L'équipe de Sanghi, en 2013, a trouvé des quantités de pesticides dépassant les doses journalières autorisées par l'Organisation Mondiale de la Santé dans le lait maternel humain. Ce domaine d'étude requiert un approfondissement et pourrait être une voie d'exposition supplémentaire pour le nouveau-né (Rauh, 2006). Surtout lorsque l'on sait que le fœtus est très vulnérable au transfert placentaire de chlorpyrifos, car le placenta échoue dans son rôle de barrière aux OP qui sont lipophiles (Whyatt, 2003). Par exemple, en prénatal, les OP ont été détectés dans l'amnios (Bradman, 2003).

b. Absorption par voie cutanée du chlorpyrifos

La voie cutanée n'est actuellement plus une voie d'exposition majeure de la population même si les enfants pourraient y être plus sensibles. De nos jours, l'exposition indirecte par voie cutanée, est la voie d'exposition principale chez les professionnels travaillant en agriculture. Dans la population générale, l'exposition a lieu à l'intérieur des domiciles et dans l'environnement résidentiel par la dissémination des pesticides principalement. Le contact avec le sol et les objets domestiques sont une voie d'exposition importante pour les plus jeunes enfants à cause de leur comportement de jeu au niveau du sol et leur contact avec les surfaces et les jeux.

i. Chez les animaux de laboratoire :

L'absorption par voie cutanée n'a été étudiée que chez peu d'espèces. L'application de combinaisons variées de chlorpyrifos et de cyperméthrine, sur la queue des rats, a causé une inhibition de l'AchE et des effets cytotoxiques dans le cerveau (Latuszynska, 2001).

ii. Chez l'Homme:

La voie d'exposition cutanée n'est pas la voie d'exposition humaine majoritaire dans la population générale ; Cependant, les enfants jouant sur le sol sont les plus exposés. Dans une

étude de l'absorption cutanée de CPF, chez 6 volontaires humains, de 1 à 2% de la dose appliquée, a été retrouvée dans les urines sous forme de métabolites, après 24h (Nolan, 1984). Une autre étude a trouvé que seulement 1% des métabolites du CPF ont été retrouvés dans les urines (Griffin, 1999). Cependant, toute la dose absorbée n'est pas éliminée dans les urines ; Donc la dose absorbée par voie cutanée dans ces études pourrait être sous-estimée. Une autre étude suggère une nouvelle explication, quand du CPF a été appliqué sur la peau environ 42 à 67% de la dose appliquée a été non absorbée, 4,3% de la dose a été excrétée dans les urines en tant que TCP_y. La quantité de TCP_y excrétée après une exposition à une dose plus forte a été similaire à la dose la plus basse, ceci indiquant que la quantité assimilée par absorption percutanée est indépendante de la dose (Meuling, 2005). L'élimination du CPF (clairance), n'a pas été complète avant 5 jours post exposition. Ceci implique que le CPF est retenu dans la peau ou dans le corps après l'exposition. D'autres études suggèrent que la formulation a également de l'importance. Aucune étude n'a étudié le métabolisme du CPF dans la peau.

c. Absorption par inhalation du chlorpyrifos:

La voie d'exposition par inhalation de CPF est une voie d'absorption minoritaire pour la population générale, cependant elle ne serait pas à négliger chez des individus vivant près de terres agricoles et particulièrement chez les enfants. Avant l'interdiction commerciale du chlorpyrifos aux Etats-Unis et en Europe, cette voie d'exposition était très commune dans la population générale, à l'intérieur des domiciles après l'application d'aérosols insecticides, sur les animaux domestiques et dans les jardins. Actuellement la voie d'exposition respiratoire est une des voies qui contribue majoritairement à l'exposition totale chez les professionnels agricoles suite à l'inhalation de vapeurs ou d'aérosols. Le CPF peut être détectée à l'extérieur des maisons après l'application sur les cultures et après la dérive aérienne du pesticide, mais ces concentrations (de 0,001 à 0,1 μ g/m$^{3)}$ sont environ 1000 fois plus faibles comparées à celles apportées par la nourriture (Saunders, 2012 ; Eaton 2008).

i. Chez les animaux:

L'absorption de CPF via les poumons est aussi très élevée chez les animaux de laboratoire. Les études chez les animaux, ont montré qu'une inhalation aigüe d'une forte dose de CPF, peut provoquer une inhibition significative de l'AchE bien que le taux d'absorption et la biodisponibilité n'aient pas été déterminés (Corley, 1989). Dans cette étude, ils ont exposé des rats par voie nasale avec différentes concentrations de CPF, pendant plusieurs semaines.

Ces niveaux d'exposition n'ont pas provoqué d'inhibition de l'AchE dans les érythrocytes ou le plasma. Bien que l'on ne doute pas que l'exposition par inhalation de CPF peut résulter en une absorption systémique, la biodisponibilité n'est pas connue avec certitude et il semble peu probable qu'une exposition par de l'air qui contiendrait moins de 10 µg/m3 pourrait inhiber significativement l'AchE. Pour comparer, des études sur des concentrations dans l'air après une pulvérisation vont de 0,1 à 0,8 µg/m3 (Byrne, 1998), soit des concentrations plus faibles que celles utilisés par Corley (1989). D'autres études ont montré que les concentrations de CPF, communes dans l'air intérieur, varient de 0,001 à 0,1 µg/m3.

ii. Chez l'Homme :

Chez les humains les travailleurs agricoles sont les plus exposés à l'inhalation de CPF. Le CPF est généralement connu pour être bien absorbé à travers les poumons à la suite d'une exposition par inhalation bien que peu d'études aient vérifié cette affirmation (Geer, 2004). Le CPF est peu volatil et très lipophile ; une exposition typique avec ce genre de composés a montré une forte absorption (Gerde, 1998). Brenner, en 1989, a évalué la prévalence de certaines maladies et symptômes nerveux chez des employés dans la production de CPF (aucune différence dans la prévalence de symptômes nerveux périphériques et centraux n'a été trouvée). Les travailleurs les plus exposés ont une réduction plus importante de l'activité de l'AchE dans leur plasma comparée aux travailleurs peu exposés.

2. Toxicocinétique du chlorpyrifos : la distribution

Suite à son absorption le chlorpyrifos atteint la circulation sanguine et il est distribué dans l'organisme. Ce pesticide est largement distribué et s'accumule dans les tissus.

2.1.Etudes de la distribution chez les animaux de laboratoire :

La concentration la plus élevée de CPF est retrouvée majoritairement dans les tissus adipeux et également dans le cerveau. Le CPF se lie à de nombreuses protéines comme l'albumine du plasma. En conséquent la fraction libre de CPF retrouvée dans le sang et qui est disponible pour la distribution dans d'autres compartiments corporels est faible. Dans une étude sur des rats, traités par voie orale, il a été démontré que le CPF s'accumule plus dans les tissus adipeux que dans les autres tissus (Bakke, 1976). Ce résultat, logique, a pour cause la forte lipophilie du CPF. Dans une étude de la distribution du CPF (Timchalk, 2002) les coefficients de répartition (basé sur une répartition des lipides dans le corps) entre les différents tissus et

le sang ont été calculés par ordre décroissant : tissus adipeux, le cerveau, le foie et les reins. Cependant ces études n'ayant pas tenu compte de la liaison du CPF et du CPF-oxon aux protéines du sang, des résultats différents pourraient être obtenus. Dans une autre étude, la concentration de chlorpyrifos dans les tissus riches en lipides, dont le cerveau, a été rapporté plus élevée et plus stable que la concentration dans le sang (Barr, 2006). Du CPF radio-marqué ([14C]-chlorpyrifos), administré par voie intra veineuse, à différents stades de gestation a été utilisé pour étudié la distribution du CPF et de ses métabolites chez la mère et le fœtus (Abdel-Rahman, 2002). La radioactivité a été retrouvée dans plusieurs tissus, 5 minutes après l'injection (sang, foie, cerveau, placenta, fœtus). Cependant, le composé original, le CPF, et non ses métabolites, ont seulement été identifiés dans le foie et le plasma de la mère, ceci indiquant un métabolisme rapide. Chez la mère, le pic de radioactivité dans le plasma a été retrouvé 5 minutes après l'injection contre 15 minutes chez le fœtus à des concentrations beaucoup plus basses. Il a été suggéré que le stockage rapide dans les tissus adipeux va déterminer le taux d'élimination global.

2.2. Etude de la distribution chez l'Homme:

Il y a eu peu d'études consacrées à la distribution du CPF et de ses métabolites dans les tissus humains cependant il se pourrait que le CPF se concentre dans le lait maternel. Toutefois, dans une étude épidémiologique effectuée chez des femmes enceintes et chez leurs nouveau-nés, exposés au CPF, par utilisation résidentielle, les chercheurs ont trouvé des concentrations de CPF dans le sang de la mère et dans le cordon ombilical, comparables et très corrélés, indiquant que le CPF passe au travers du placenta (Whyatt, 2005). De plus, compte tenu que la concentration de CPF est plus élevée dans les tissus adipeux, il serait logique de retrouver le CPF dans le lait maternel, riche en lipides, des femmes à des concentrations supérieures à celles du sang. Une étude, en Inde, a trouvé un taux relativement élevé de chlorpyrifos dans le lait de mères pendant l'allaitement ; Des études plus poussées seraient nécessaires pour évaluer les risques auxquels les nourrissons sont soumis (Sanghi, 2003).

3. Toxicocinétique du chlorpyrifos : le métabolisme

Pendant et après son transport dans le sang, le chlorpyrifos va entrer en contact avec des enzymes de biotransformation ; ses métabolites vont être produits, tous plus ou moins toxiques. On parle alors respectivement d'activation ou de détoxification. Le chlorpyrifos

est rapidement métabolisé. Les métabolites principaux sont le TCP_y et ses conjugués, DEP, DETP et le chlorpyrifos-oxon. De plus, les conjugués du glutathion et des sous-métabolites ont aussi été identifiés. Il existe des différences interindividuelles dans le métabolisme du chlorpyrifos (en fonction de l'âge, de l'espèce et du sexe).

3.1. Les différentes étapes du métabolisme du chlorpyrifos

Le métabolisme du CPF notamment par le foie a été beaucoup étudié, in-vivo et in-vitro, et a été décomposé en plusieurs étapes (**Fig. 2**):

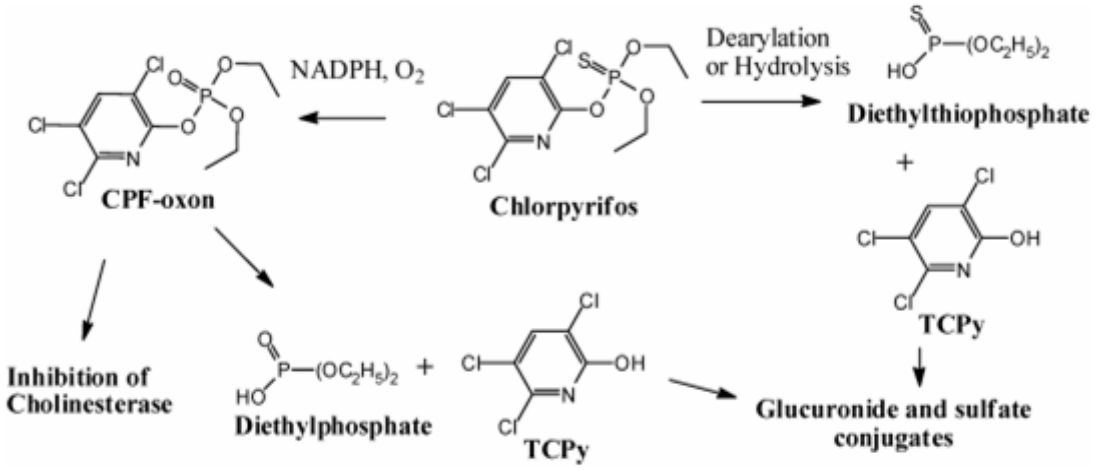


Fig. 2: Etapes de biotransformation du chlorpyrifos (Eaton, 2008)

a. La désulfuration du chlorpyrifos et la formation du chlorpyrifos-oxon:

La désulfuration oxydative du CPF conduit à la formation d'un métabolite toxique le CPF-oxon. Cette réaction de désulfuration est dépendante d'un isoforme du cytochrome p-450 (Needham, 2005; Sultatos, 1983). Les atomes de souffre, activés pendant ce processus de désulfuration, peuvent se lier irréversiblement au cytochrome P-450, ce qui catalyse la réaction. Ainsi le chlorpyrifos agit comme un substrat "suicidaire" et ceci a pour conséquence de réduire le temps d'activité du P-450 (Sultatos, 1994). C'est l'étape la plus importante, car le CPF-oxon est le métabolite qui présente une activité anti-cholinestérase. Il est donc responsable de la toxicité du CPF par l'inhibition de l'AchE. En effet, le CPF, seul, n'est pas capable d'inhiber l'AchE à un niveau significatif (Chambers, 1992). De nombreux auteurs

ont donc utilisé l'inhibition de l'activité de l'AchE pour estimer les taux de la formation de CPF-oxon depuis le CPF.

b. L'hydrolyse du chlorpyrifos-oxon et la formation du TCP_y

Le CPF-oxon est ensuite spontanément ou de manière enzymatique hydrolysé, c'est une détoxification. Le métabolite obtenu est le diéthylphosphate et 3,5,6-trichloro-2- pyridinol (TCP_y). C'est la voie principale de détoxification du CPF-oxon. L'enzyme paraxonase joue un rôle clé dans cette voie (Eaton, 2008; Barr, 2006), mais d'autres enzymes estérases sont aussi impliquées.

c. La déarylation ou l'hydrolyse du chlorpyrifos en TCP_y

L'hydrolyse et la déarylation oxydative du CPF (perte d'un radical aryle, qui est un dérivé d'un cycle aromatique), conduisent également à la formation du TCP_y et DETP via une réaction médiée par des oxonases (aesterases comme la paraoxonase) ou des cytochromes P-450 (Jokanovic, 2001). C'est une étape de détoxification car ces métabolites n'ont plus d'activité anti cholinestérasique (Sultatos, 1984). Par ailleurs, des isoformes, spécifiques du cytochrome P-450 et des oxonases, ont des capacités différentes à détoxifier le CPF et sa forme oxon. Ce métabolisme est très rapide et important. Donc le taux de chlorpyrifos dans le sang est très bas en comparaison des métabolites.

d. Conjugaison au glutathion du TCP_y

La conjugaison au glutathion est la phase secondaire de détoxification, le glutathion se combine au chlorpyrifos qui devient hydrosoluble. Elle est médiée par la glutathion S-transférases. Le conjugué au glutathion est formé principalement dans le foie et excrété dans la bile sous forme de conjugués cystéine puis dans les fèces. Mais il peut également être excrété dans d'autres tissus comme les reins puis dans les urines. Les conjugués au glutathion du CPF ont été détectés dans le foie de souris traitées au CPF (Fujioka, 2007), suggérant que ce pourrait être une voie significative dans le métabolisme du CPF.

e. Conjugaison à l'acide glucoronique et au sulfate du TCP_y

La conjugaison à l'acide glucoronique et au sulfate du TCP_y permet d'obtenir des métabolites hydrosolubles plus rapidement éliminés. Le groupe hydroxyle libre provenant de l'hydrolyse du TCP_y peut être conjugué, dans divers tissus, avec l'acide glucoronique ou avec

le sulfate. Cela résulte en des produits plus hydrosolubles qui peuvent être excrétés dans la bile ou les urines. Les métabolites produits sont potentiellement actifs et peuvent avoir des modes d'action différents. Quelques-unes de ses actions potentielles sont très probablement formées dans le foie, le cerveau et les fœtus en voie de développement. Malheureusement, peu d'études se sont intéressées aux doses de CPF nécessaires pour avoir des niveaux significatifs de tels métabolites. De même la pertinence de leurs effets secondaires chez les humains n'est pas connue.

3.2. Spécificité des marqueurs

Le métabolite du CPF, le TCP_y et le CPF-oxon, sont utilisés comme biomarqueurs spécifiques d'exposition au CPF. Ils peuvent être détectés spécifiquement dans les urines. Mais on peut également y détecter d'autres métabolites du CPF comme des dialkyl phosphate (DAP) : le diéthylphosphate (DEP) et le diéthylthiophosphate (DETP). Ces métabolites sont formés à partir de presque tous les OP (Gibson, 1998). En effet, 75% des pesticides organophosphorés sont bio transformés en DETP, DEP et autres DAPs. Il est donc difficile d'être catégorique quant à l'origine de ces marqueurs car ils ne peuvent pas être distingués de métabolites, produits à partir d'autres pesticides que le chlorpyrifos, et absorbés dans l'organisme (Needham, 2005).

3.3. Différences interindividuelles de métabolisme du chlorpyrifos

Il existe des différences de métabolisme du chlorpyrifos chez les fœtus, les nouveau-nés, les enfants et les adultes (Saunders, 2010). Cette différence se traduit en termes de sensibilité à la toxicité du chlorpyrifos

a. Différences liées au stade développemental

De nombreuses études ont montré qu'il existe une différence de sensibilité à la toxicité du CPF liée à l'âge, les jeunes animaux étant plus sensibles. Cette plus grande sensibilité a été démontrée par plusieurs équipes de chercheurs (Whitney, 1995; Moser, 1998; Zheng, 2000). Il a été prouvé que la sensibilité à la toxicité du CPF est neuf fois plus forte chez les rats nouveau-nés (7 jours) par rapport aux rats adultes (90 jours). La dose létale est de 15mg/kg chez les nouveaux nés, pour les adolescents (21 jours), elle est de 47mg/kg et chez les adultes elle est de 136mg/kg. La dose létale du chlorpyrifos en postnatal (PND 7) est 10 fois plus basse que chez les adultes (Zheng, 2000). La dose sans effet (No Observed Effect Level)

NOEL, basé sur l'inhibition de l'AchE est de 4,5mg/kg/jour chez les nouveaux nés et de 7,5mg/kg chez les adultes (Zheng, 1999). L'équipe de Timchalk en 2006, a étudié l'influence de l'âge de jeunes rats (5, 23 et 17 jours) sur leurs capacités métaboliques lorsqu'elles sont comparées à celles des rats adultes. Pour chaque groupe de jeunes rats et d'adultes, le taux de détoxification via la formation de TCP_y dépasse significativement le taux de formation du métabolite toxique CPF oxon. Il a été conclu que, même chez les jeunes animaux de 5 jours, le niveau de détoxification (formation de TCPy) dépasse le niveau d'intoxication (formation du CPF-oxon). Cependant, les plus jeunes animaux ont montré une plus grande sensibilité à l'inhibition de l'AChE (inhibition dans le sang et le cerveau). Le cerveau pourrait être particulièrement sensible chez les plus jeunes individus (Moser, 1998). L'explication de cette plus forte sensibilité à la toxicité du CPF a été attribuée à des compétences métabolites incomplètes durant le développement (Kousba, 2007). La capacité de détoxification est plus faible chez les jeunes (les activités de la paraxonase et de la carboxylase sont diminuées, Eaton, 2008). De plus, il a été observé que la concentration de CPF dans le sang est plus basse chez les adultes que chez les animaux les plus jeunes, pour les mêmes doses, ceci indiquant que les jeunes ont une capacité globalement plus basse à métaboliser le CPF (Timchalk, 2002b). Donc, les individus les plus jeunes détoxifient les toxiques plus lentement que les adultes. Ainsi, la dose qu'ils reçoivent reste plus longtemps dans leur organisme. La dose de pesticide par kilo de poids est également plus importante (Eaton, 2008).) Ainsi des effets neurotoxiques développementaux pourraient être observés chez les individus en développement à des doses plus basses que les doses recommandées par les différences agences de santé publique à cause de leur plus faible capacité à métaboliser le CPF.

b. Différences génétiques et d'expression de PON1

Ces différences de sensibilité ont tout d'abord été expliquées par des différences génétiques et d'expression de protéines entre les individus. En effet, il existe un polymorphisme génétique considérable au niveau du gène codant pour l'enzyme clé de détoxification du CPF-oxon, la paraoxonase (PON1). Cette enzyme joue un rôle majeur dans la modulation de la toxicité du CPF-oxon. En fonction du génotype, la capacité à détoxifier le chlorpyrifos diffère. C'est un facteur de prédisposition génétique qui augmente la sensibilité, avec une variation de 1 à 13 fois plus sensible chez les adultes (Furlong 2005 et 2006). Une concentration prénatale élevée en métabolite des OP dans les urines des mères est associée avec une altération du développement mental à 12 mois au sein de populations noires et hispaniques. Cette

association semble être corrélée avec la présence d'un certain allèle de la paraxonase chez ces mères (Engel, 2011, Berkowitz, 2004). Par ailleurs, ces différences de sensibilité à la toxicité du CPF pourraient être dues à une différence d'expression du gène PON1. Il a été montré qu'une sensibilité augmentée chez les nouveaux nés pourrait être due à la réduction des niveaux d'expression de PON1, qui sont 3 à 4 fois plus bas que chez l'adulte (Furlong, 2005). Il pourrait également y avoir des différences dans l'absorption et la distribution dans les tissus du CPF et de ses métabolites plutôt qu'une différence de sensibilité intrinsèque de l'AchE (Eaton, 2008).

4. Toxicocinétique du chlorpyrifos : l'élimination

Les organophosphorés sont rapidement métabolisés et presque entièrement excrétés dans les urines (Aprea, 2000). L'élimination du CPF du sang, sa clairance, est très rapide. Il existerait une élimination plus lente à partir d'un compartiment secondaire, qui est due à une liaison à des protéines du plasma et la distribution de CPF dans les tissus adipeux peu perfusés. Ces métabolites sont excrétés dans les urines en 48h ou forment des glycurono- et sulfoconjugués qui sont aussi excrétés dans les urines (Eaton, 2008).

C. Processus pathophysiologiques du chlorpyrifos

La population générale, et particulièrement les enfants peuvent donc être exposés au chlorpyrifos qui peut pénétrer dans l'organisme et, dans certaines conditions, produire ses effets toxiques. Le chlorpyrifos peut alors déclencher une réponse patho-physiologique de l'organisme et des conséquences cliniques. Les mécanismes de toxicité du chlorpyrifos n'ont pas été tous clairement définis. En effet, à forte dose l'inhibition de l'acétylcholinestérase a été démontrée. Cependant, à faible doses des effets comportementaux ont été démontrés expérimentalement, dont le mécanisme reste à ce jour inconnu.

1. L'acétylcholinestérase et la toxicité aigüe

La toxicité aigüe est définie comme résultante de l'exposition unique et massive à un produit chimique, sur une période inférieure à 24h (CNESST, 2017). Le mécanisme de toxicité aigüe du CPF est l'inhibition de l'acétylcholinestérase.

1.1. L'acétylcholine dans le système nerveux

La cible toxicologique traditionnelle pour les OP, à forte dose, est l'altération de la fonction cholinergique du système nerveux et en particulier l'altération du métabolisme de l'acétylcholine. L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui propage l'information électrique via des récepteurs muscariniques et nicotiniques. Cette information est transmise des neurones pré-ganglionnaires aux neurones post-ganglionnaires dans les divisions sympathiques et parasympathiques du système nerveux périphérique. Elle transmet également l'information des nerfs moteurs périphériques somatiques aux fibres des muscles squelettiques ainsi que dans la moelle épinière. Enfin, l'acétylcholine conduit les informations entrantes et sortantes du cerveau ainsi qu'à l'intérieur même du cerveau (Eaton, 2008). L'enzyme acétylcholinestérase (AchE) catabolise l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques, dans la membrane post-synaptique. Ce catabolisme va empêcher l'action de l'acétylcholine et permettre son recyclage (Eaton, 2008; Pereira, 2014). Le système nerveux central et périphérique est donc la première cible du CPF.

1.2. Inhibition de l'acétylcholinestérase par le chlorpyrifos

Le mécanisme primaire de la toxicité du CPF est dû à la capacité de son métabolite CPF-oxon à se lier à l'AchE et à l'inhiber de manière irréversible. Une telle inhibition de l'enzyme résulte en la diminution de la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine et par conséquence son accumulation au niveau des jonctions synaptiques. Ceci provoque une stimulation excessive/prolongée des récepteurs post-synaptiques cholinergiques et ainsi une hyperstimulation des récepteurs muscariniques et nicotiniques. Ces récepteurs sont retrouvés dans de nombreuses localisations cérébrales. Il a été démontré que l'exposition au CPF entraine notamment des altérations de l'activité de l'AchE dans le mésencéphale, le tronc cérébral et le striatum (Slotkin, 2004).

1.3. La toxicité du chlorpyrifos au niveau moléculaire: (ATSDR)

Les organophosphorés dont le chlorpyrifos forment une liaison covalente avec le site actif de l'acétylcholinestérase et sont considérés comme des inhibiteurs irréversibles de cette enzyme.

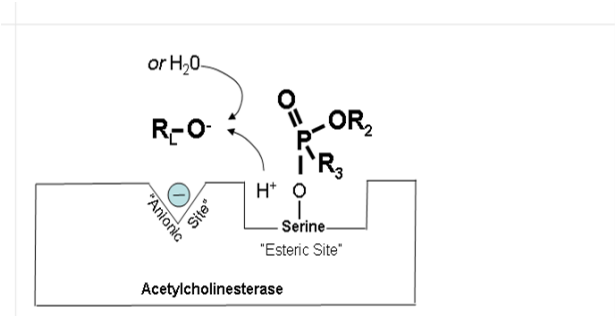


Fig. 3: L'inhibiteur de l'acétylcholinestérase empêche la liaison du ligand l'acétylcholine (Liu, 2013).

Au niveau moléculaire les OP, en général, ont une liaison phosphore-oxygène (P=O). Cette liaison phosphoryle un groupe hydroxyle présent sur l'acide aminé serine, du site actif de l'enzyme AchE (**Fig.3**). Cette phosphorylation empêche ainsi l'action de l'AchE qui ne peut hydrolyser ses substrats. Par ailleurs, en cas d'intoxication, la libération de l'AchE, c'est à dire l'hydrolyse de la liaison la liant au pesticide à un rythme très lent. Cependant, cette hydrolyse peut être facilitée par certains agents chimiques (les oximes comme le pralidoxime) qui sont utilisés en cas d'intoxication aux OP. De plus, lorsque le complexe enzyme-inhibiteur a " pris de l'âge", c'est à dire qu'il a perdu un de ses deux groupes alkyl, l'AchE ne peut plus être libérée ou réactivée par l'oxime et elle est irréversiblement inhibée. Le seul moyen de remplacer son activité et de produire de nouvelles enzymes et ce processus peut prendre quelques jours. L'atropine, en se fixant, à forte dose, sur les récepteurs muscariniques, est l'antidote principal lors d'une intoxication au OP.

1.4. Caractérisation de la toxicité aigüe, le DL50 du chlorpyrifos

Une façon pratique de caractériser la toxicité d'une substance consiste à déterminer sa dose létale médiane (DL50). La DL50 est une valeur statistique de la dose d'une substance dont l'exposition par voie orale provoque la mort de 50 % des animaux traités dans des conditions d'expérimentation précises. Cette dose permet d'identifier les symptômes de l'intoxication et de comparer les substances entre elles quant à leur potentiel toxique. Pour le CPF, par voie orale, chez le rat, expérimentalement, les doses toxiques aigües rapportées sont de 3128 mg/kg p.c. selon l'EFSA, de 50-500mg/kg p.c. selon l'EPA et de 66 à 195mg/kg p.c. selon l'Anses (AGRITOX, 2015).

2. Les différents syndromes provoqués par le chlorpyrifos

2.1.Le syndrome cholinergique

Un syndrome cholinergique peut apparaitre via l'hyper-activation des récepteurs cholinergiques de type muscarinique et cholinergique qui sont localisés dans la plupart des organes. Ce syndrome inclut un dysfonctionnement du système nerveux autonome avec une augmentation de la sudation, de la lacrymation, de la salivation, une incontinence urinaire et fécale, des secrétions bronchiques profondes, une bronchoconstriction, un myosis, une motilité gastro-intestinale augmentée, des tremblements, des contractions musculaires et divers effets liés au système nerveux central, dont une désorientation et un coma (Ecobichon, 1996 ; Liu 2013). A très forte dose, quand la mort arrive, elle est due à un arrêt respiratoire causée par l'inhibition des centres respiratoires dans le tronc cérébral, par la bronchoconstriction et par l'augmentation des secrétions bronchiques ainsi qu'une paralysie flaccide des muscles respiratoires (Eaton, 2008).

2.2. Le syndrome intermédiaire:

En plus du syndrome cholinergique aigu, les OP peuvent aussi causer un syndrome intermédiaire. Ce syndrome est observé dans 20–50% des cas d'empoisonnement aigus aux OP. Il se manifeste, quelques jours après l'empoisonnement, pendant le rétablissement ou après un rétablissement total dans quelques cas. Les symptômes majeurs sont une fatigue marquée des muscles respiratoires, du cou et des membres. Les mécanismes sont inconnus mais on suspecte des dommages secondaires après une stimulation excessive des jonctions neuromusculaires durant la phase de toxicité cholinergique.

2.3.La neurotoxicité retardée

Plus rarement, il peut être observé, 8 à 14 jours après l'exposition aux OP, une poly-neuropathie périphérique retardée, dont le mécanisme proviendrait d'une dégénérescence des nerfs. Ce syndrome neurodégénératif est caractérisé par une ataxie progressive évoluant vers une paralysie concomitante à une axonopathie distale, centrale et périphérique. Les symptômes observés chez les humains sont : des picotements dans les mains et pieds, suivis d'une perte sensorielle, une faiblesse musculaire progressive et une flaccidité des muscles squelettiques (Emerick, 2012 ; Jokanović, 2011). Les mécanismes de cette neuropathie sont une phosphorylation et une inhibition d'une enzyme cible (« neurotoxic esterase ») et un

déséquilibre dans l'homéostasie calcique cellulaire. Ceci entraine une phosphorylation aberrante des protéines du cytosquelette et des protéines de digestion dans les axones terminaux (Emerick, 2012).

3. Effets non neurotoxiques du chlorpyrifos

Les effets non neurotoxiques du CPF sont peu nombreux et peu connus. Le système nerveux central et périphérique est la cible principale et la plus étudiée du CPF. Il y a peu de preuve que le CPF ait des effets toxiques sur des tissus autre que ceux du système nerveux à des doses moindres que celle provoquant des effets neurologiques. Le CPF n'est pas tératogène à des doses sans effet maternotoxique. Il n'est pas, non plus, mutagène ni cancérogène. Il n'y a pas eu d'effets hépatotoxiques, néphrotoxiques ni immunotoxiques à des doses en dessous de celles provoquant une altération de l'AchE. Ce pesticide n'est pas considéré comme ayant un potentiel cardiotoxique, et il n'est pas signalé comme toxique pour la reproduction et le développement (European Commission, 2005). Cependant en 1999, l'équipe de Reigart et Roberts, ont suspecté ou rapporté des conséquences retardées d'une exposition à faible ou forte dose au CPF comme de la stérilité, de l'infertilité, des maladies neurodégénératives et des cancers. Une étude, aux Etats-Unis, a démontré une corrélation négative entre la fertilité chez l'homme et la concentration en métabolite du CPF dans les urines. Mais cette a été menée chez des hommes présentant déjà des concentrations anormales de métabolite par rapport aux valeurs normales de la population américaine (Eaton 2008). Enfin, une exposition chronique au CPF a été associée avec une diminution du poids et de la taille à la naissance (Whyatt, 2004).

D. Evaluation des risques sanitaires du chlorpyrifos pour la population générale:

L'appréciation des risques liés au chlorpyrifos dépendent du contexte social, culturel, politique, économique et judiciaire du pays dans lequel ce pesticide est utilisé. La balance bénéfices/risques, les considérations éthiques, le poids de la preuve de sa toxicité vont faire varier les réglementations contrôlant son utilisation.

1. Réglementation générale concernant le chlorpyrifos

En matière de réglementation européenne, cette substance active est inscrite à l'annexe I de la directive 91/414/CEE sur la mise sur le marché de pesticides, par la directive 2005/72/CE spécifique pour le chlorpyrifos et par la réglementation sur les pesticides UE 1107/2009 qui expire le 31/01/2018. En France, cette substance active est autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d'une autorisation de mise sur le marché. Aux Etats-Unis elle est régulée par l'EPA (United State Environmental Protection Agency). Le CPF est considéré comme ayant une toxicité aigüe par voie orale (il est classé comme classe « T, R25 » ou « Acute Tox. 3 » selon la Réglementation (EC) No 1272/2008 [CLP]). Il est considéré comme dangereux s'il est absorbé par la peau (Xn; R21), mais n'est pas considéré comme ayant une toxicité aigüe par inhalation. Il n'est pas considéré comme un irritant pour la peau ou les yeux ni ayant un pouvoir allergique sur la peau (European Commission, 2005).

1.1. Evaluation des risques et limites réglementaires :

Il existe plusieurs valeurs toxicologiques de référence pour prendre en maitriser les risques liés au CPF. Le NOAEL (« no observed adverse effect level ») ou la dose sans effet nocif observable en français. Ceci est défini, pour un lot d'animaux de laboratoire soumis à l'essai pendant une période déterminée, par la quantité maximale de substance dont l'absorption quotidienne ou unique n'entraîne aucun effet sur les animaux testés. Le NOAEL (Anses, AGRITOX, 2015) pour le CPF est :

- Pour la toxicité par voie orale, par exposition répétée (90 jours), chez le rat, le NOAEL est de 1 mg/kg p.c./j. Cette dose est mesurée par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase érythrocytaire et plasmatique de toutes les espèces. Sur des études, aussi bien sur le court et que sur le long terme, suivant le « Joint Meeting on Pesticide Résidus »(JMPR, 1995), seule la diminution de l'AchE du cerveau a été considérée comme toxicologiquement pertinente.
- La neurotoxicité aiguë (28 jours), par voie orale, chez le rat a un NOAEL de 10 mg/kg p.c./j

Pour protéger l'homme du risque que pourrait représenter le CPF, le NOAEL, est à minima, divisée par 100 (facteur d'incertitude) pour obtenir l'ADI (« acceptable daily intake »), ou la dose journalière admissible pour le consommateur (DJA). L'ADI correspond à une estimation de la quantité de CPF présente dans les aliments ou l'eau de boisson qui peut être ingérée, tous les jours, sans risque appréciable pour la santé du consommateur ; elle a été estimée à

0,01mg/kg p.c./jours. Cette dose est basée sur des études par administration répétée, sur le court et long terme, dans toutes les espèces (Review Report, European Commission, 2005). La dose aiguë de référence (ARfD) était de 0,1 mg/kg p.c./jours basée sur le NOAEL de la neurotoxicité aiguë et retardée dans des études chez les rats avec un facteur d'incertitude de 100 (Anses2014, EFSA 2014, AGRITOX, 2015).

1.2. Nouvelles limites réglementaires :

Les Etats-Unis ont revu leurs valeurs toxicologiques de références pour une meilleure prise en compte des risques liés au CPF. En 2000, l'EPA des Etats-Unis (US EPA, 2011), a conclu que l'inhibition de l'AchE était le marqueur le plus sensible de la toxicité du CPF, chez les rats, souris, lapins, chiens et humains. Chez les animaux, l'inhibition significative de l'AchE dans le plasma et dans les érythrocytes, apparait à des doses inférieures à celles du cerveau. L'activité enzymatique dans le plasma est beaucoup plus sensible à l'activité du CPF-oxon que celle dans les érythrocytes ; c'est donc la mesure de l'activité enzymatique dans le plasma qui est plus sensible et qui sert de biomarqueur à cette toxicité. Une exposition journalière répétée à du CPF à moins de 0,10mg/kg/jour pendant 90 jours, n'a pas d'effet discernable sur l'activité de l'AchE dans le plasma (Eaton 2008). Les nouvelles valeurs proposées sont, après une exposition répétée chez le rat:

- NOAEL est de 0,1 mg/kg de poids corporel par jour pour le chlorpyrifos
- NOAEL est de 0,01 mg/kg de poids corporel par jour pour le chlorpyrifos-oxon
- Le nouvel ADI obtenu avec un facteur de 100 est de 0,001 mg/kg de poids corporel par jour.

Ceci est basé sur l'inhibition de l'AchE des érythrocytes

Après une exposition aigüe, pendant 28 jours:

- Le NOAEL est de 0,5 mg/kg de poids corporel par jour pour le chlorpyrifos
- L'ARfD après une seule exposition d'après les nouvelles études, est donc de 0,005 mg/kg de poids corporel.

2. Poids de la preuve

2.1. Le chlorpyrifos danger ou risque pour la santé dans la population générale?

Le danger, c'est le potentiel d'un agent chimique, physique ou biologique à provoquer un effet néfaste sur la santé. Le risque, c'est la probabilité que cet effet néfaste se produise en raison de l'exposition des personnes au danger. Peut-on vraiment parler de danger pour le CPF ? Autrefois, lorsque l'application résidentielle avait cours, Fenske en 1990, a trouvé, qu'après une pulvérisation sur les surfaces domestiques que la dose de CPF absorbée par les enfants était au-dessus de la NOAEL déterminée par l'EPA de 0,03 mg/kg/jour, chez l'homme. L'équipe de Venerosi, en 2006, a estimé l'exposition des enfants suite à une application domestique à 1 à 3mg/kg. De nos jours, une étude a mesuré des concentrations de CPF supérieures à la limite de quantification de CPF dans différents aliments (% des analyses), le CPF a été retrouvé dans 10,20% des fruits étudiés, 4,83% des légumes et 0,01% de l'eau (Anses, 2013). L'apport journalier moyen estimé pour ces mêmes aliments chez les enfants de 3 à 14 ans est de 0,53% du DJA. Ceci a été testé pour différents aliments; le % du DJA est toujours minime. Par exemple, pour l'abricot, en 2011, les enfants de 3 à 17 ans ont une contamination moyenne estimée de 0,0001 mg/kg (scénario haut) ce qui correspond à 0,1% du DJA mais qui correspondant à 10% de la DJA de 0,001 mg/kg établie par l'EPA aux Etats-Unis. L'Anses a estimé que le risque associé au CPF était très faible. En 2011, l'EPA a estimé que la population américaine ingérait 0,009 µg de CPF par kg de poids du corps par jour, directement par l'alimentation avec une plus forte dose chez les enfants (0,025 µg par kg/poids et par jour), ces valeurs ne dépassant pas les DJA règlementaires. Cependant suite à la publication de nouvelles valeurs toxicologiques de référence pour le chlorpyriphos-éthyl par l'EFSA, l'Anses a réévalué avec le nouveau document guide de l'EFSA des risques pour la santé humaine. L'autorisation de mise sur le marché a été retirée pour trois spécialités en septembre 2016 (AMM). Il s'agit du Pyrinex ME® (fabricant : Adama), du Nurelle D220 ®(Arysta) et du Nurelle D550® (Arysta). En Octobre 2015, l'EPA a émis une proposition pour revoir les normes réglementaires concernant le CPF en interdisant toute utilisation qui laisserait des résidus quantifiables dans la nourriture. Les résultats de cette enquête seront rendus publics en 2017.

2.2. Etudes épidémiologiques

Les inquiétudes concernant le risque que présente le CPF s'appuient sur des études épidémiologiques. Ces études, sur des larges cohortes, ont été réalisées dans les années 90 pour examiner les voies potentielles d'exposition des femmes et des enfants au CPF ; les résultats obtenus ont pu sembler alarmants (cf. rapport du NHANES : « national health and nutrition examination survey »,1999-2000), avec 91% des échantillons d'urines collectés dans la population américaine, possédant le métabolite TCP_y. D'autres études ont mesuré la concentration de CPF sur les surfaces (ng de CPF/cm²) comme sur le sol, les jouets, la surface corporelle et également en évaluant l'exposition via l'alimentation (Trunnelle, 2014). La plupart de ces études ont utilisé la concentration urinaire en TCP_y comme biomarqueur de l'exposition au CPF. Les études épidémiologiques publiées sur l'exposition au CPF ont des niveaux d'exposition qui excèdent les expositions typiques de la population générale des Etats-Unis (par exemple suite à une application unique d'un insecticide à l'intérieur et autour des maisons) et donc ne représentent pas l'exposition actuelle. Cependant, plusieurs études se sont focalisées sur des familles provenant de populations agricoles vivant sur ou près des exploitations agricoles qui utilisent du CPF comme pesticide, et ceci est bien représentatif de l'exposition potentielle actuelle (Eaton, 2008). Pourtant, une étude de l'équipe de Trunnelle en 2014, a détecté, sur des échantillons collectés entre 2007 et 2009, du CPF dans 98,7% des surfaces de résidences de Californie. Ceci suggérant que l'exposition résidentielle aux insecticides est toujours une importante source de CPF et notamment chez les enfants.

a. Enquêtes épidémiologiques et biomarqueurs utilisés

Pendant ces deux dernières décennies, l'estimation de l'exposition au CPF a reposé sur l'utilisation du biomarqueur peu spécifique, le TCP_y, métabolite du CPF. Jusqu'à récemment, presque toutes les études ont supposé que l'exposition quotidienne au CPF était la seule source de TCP_y retrouvé dans les urines. En se basant sur ces suppositions, il est apparu que le CPF était mesuré dans des échantillons d'urine à des concentrations supérieures à la limite de quantification (de 3 à 5 mg/l d'urine) dans de nombreuses études épidémiologiques sur la période 1995-2001. Cependant, il est maintenant reconnu que le TCP_y, utilisé comme biomarqueur dans ces études, est inadéquat pour mesurer l'exposition au CPF. En effet, ses résidus sont fréquemment retrouvés sur les fruits et légumes, souvent à des concentrations 10 fois plus élevées que le CPF. Il est très probable que l'exposition au CPF ait été surestimée de 10 à 20 fois. De manière plus surprenante, peu d'études ont déterminé l'exposition de la

population au CPF depuis son élimination de l'usage résidentiel en 2001. Ceci est un handicap majeur dans la détermination les risques actuels liés au CPF. L'équipe d'Eaton, en 2008, a estimé que l'exposition typique au CPF, dans le passé, était de l'ordre de 0,001–0,01 µg/g, et provenait largement de la nourriture; l'exposition actuelle est très certainement bien en dessous de la DJA. Cependant, il peut exister une exposition spécifique au CPF (comme pour les familles d'employés agricoles qui vivent dans de zones agricoles où la pulvérisation intensive du pesticide est fréquente). Ainsi, des études futures doivent s'attacher à distinguer entre des expositions au CPF lui-même et au TCP_y (Eaton 2008). Par ailleurs, l'EFSA, en 2014, a publié un rapport qui regroupe les études épidémiologiques montrant une association entre l'exposition aux pesticides, dont le CPF, et certains aspects du neuro-développement. L'hétérogénéité et la complexité des méthodes étudiées pour mettre en évidence ces associations, des effets pour la plupart non significatifs et l'absence de méta-analyse sur le sujet, ont incité l'EFSA à conclure que le poids de la preuve est insuffisant. Les résultats sur ces associations doivent être interprétés avec précaution.

b. Extrapolation des résultats des études expérimentales à la population générale

La voie d'exposition, la dose d'exposition et la méthodologie employées sont très importantes (le choix des espèces, la méthode d'échantillonnage et d'analyse), ceci rend difficile l'extrapolation de résultats de toxicologie obtenus sur des animaux de laboratoire à la population humaine. Les doses de CPF employées en toxicologie expérimentale chez les animaux de laboratoire sont généralement deux fois plus élevées que les doses auxquelles les professionnels sont exposés. Celles-ci sont également beaucoup plus élevées que celles auxquelles est exposée la population en général (suite à la consommation d'aliments et l'usage agricole). La majorité des études de la toxicité sur le long terme ont utilisé la voie orale comme voie d'exposition avec des doses allant de 0,05 à 25mg/kg de poids corporel et par jour. Des études sur le court terme, se basant sur l'inhalation du pesticide, ont utilisé des doses allant de 3 à 5000 µg/m3. A cause des grandes différences de doses de la plupart des études toxicologiques et la dose à la laquelle la population générale est réellement exposée, il faut être prudent dans l'extrapolation de la toxicocinétique et du métabolisme d'études faites à hautes doses à des doses plus faibles et vice versa. Les animaux de laboratoire (surtout les souris et les rats) ont été largement utilisés dans les études toxicologiques du CPF et pour comprendre les mécanismes de toxicité. Cependant, il a été suggéré que le CPF a des effets

neurotoxiques à des doses inférieures aux valeurs toxicologiques de référence (VTR), comme la DJA. L'AchE n'est peut-être pas le marqueur le plus sensible pour la neurotoxicité. L'équipe de Saunders, en 2010, a interrogé un grand nombre d'experts en toxicicologie; ces chercheurs ont des avis divergents sur la réelle neurotoxicité développementale du chlorpyrifos, et préconisent des recherches supplémentaires et une meilleure information du public. Ces experts avancent qu'il n'y a pas assez de données sur des effets à doses faibles, sub-toxiques et la plupart des études épidémiologiques ayant été réalisées aux Etats-Unis et non en Europe.

2.3.Cas particulier des enfants

Comme nous l'avons vu, précédemment les enfants sont particulièrement sensibles à la neurotoxicité du CPF. Tout d'abord à cause de leur comportement spécifique (objet à la bouche, jeu sur le sol…) et à cause de leurs caractéristiques intrinsèques (faible volume corporel et donc exposition maximale par voie cutanée, pulmonaire et orale, métabolisme différent de celui des adultes). Les enfants pourraient être exposés à des doses supérieures aux VTR à cause de l'accumulation de CPF dans leur milieu de vie et particulièrement chez les enfants des communautés agricoles ou vivant à proximité d'exploitations agricoles (facteur qui n'est jamais pris en compte dans les enquêtes épidémiologiques). Les enfants ont par ailleurs un cerveau qui se développe jusqu'à l'adolescence et celui-ci est particulièrement sensible aux agents toxiques extérieurs. La perturbation du développement normal du cerveau peut ensuite conduire à des effets sur le long terme, pendant l'adolescence et l'âge adulte. Par ailleurs, leurs enzymes de détoxification du CPF sont également moins performantes que celles des adultes. Les enfants font donc partie de la population la plus sensible à la toxicité du CPF, et cette sensibilité accentuée n'est pas prise en compte dans les règlementations du CPF. Il a été proposé un nouveau mécanisme de neurotoxicité du CPF qui va être l'objet notre étude expérimentale. Ce mécanisme ne met pas ou peu en jeu l'inhibition de l'AchE. Il serait un marqueur plus sensible de toxicité du CPF, et permettrait d'évaluer l'exposition à faible dose, sur le long terme, au CPF et particulièrement chez les enfants, la population la plus sensible.

II. Neurotoxicité comportementale du chlorpyridos : étude expérimentale

L'exposition au chlorpyrifos a été associée à des problèmes comportementaux et des déficits cognitifs sur le long terme chez les animaux de laboratoire et chez les enfants. De plus, plusieurs études montrent une possible association entre l'exposition au chlorpyrifos et l'altération du développement du cerveau qui se retrouve à l'échelle cellulaire et tissulaire. Un nouveau mécanisme de neurotoxicité, basé sur le système des endocannabinoïdes, à de faibles doses de chlorpyrifos, sur long terme va être étudié.

A. Neurotoxicite développementale du chlorpyrifos : contexte de l'étude expérimentale

L'étude expérimentale va porter sur la neurotoxicité développementale du chlorpyrifos, à faible dose, chez le Rat. Seront étudié les effets sur le comportement d'une exposition à ce pesticide, pendant la période correspondante à l'enfance humain,. Les effets sur le comportement vont être observés pendant la période correspondant à l'adolescence humaine. Nous allons aborder comment le chlorpyrifos peut impacter le développement du cerveau et donc le comportement et par quels mécanismes.

1. Le développement du cerveau se poursuit jusqu'à l'adolescence

Pour comprendre les effets d'une toxicité neuro-développementale chez le rats et ainsi pourvoir extrapoler les résultats obtenus aux enfants, il faut choisir une période de traitement au chlorpyrifos pendant laquelle le cerveau des rats et des enfants est en cours de développement.

1.1. L'adolescence chez le rat

Chez le rat, le développement du cerveau ne s'arrête pas à la naissance, en effet, il continue pendant la période post-natale jusqu'à l'adolescence. L'adolescence est la période de transition entre l'enfance et l'âge adulte, c'est-à-dire entre le post-sevrage et la maturité sexuelle (approximativement entre les jours postnataux (PND) 21 à 40), cette phase est conservée chez tous les mammifères. C'est une période de transition comportementale, caractérisée par une augmentation de la sensibilité aux autres individus et aux indices sociaux. Il est observé un engagement dans des relations sociales avec d'autres individus ne lui étant pas apparentés. L'adolescence est par ailleurs caractérisée par des comportements de

prise de risque et un fort taux d'impulsivité. Ces comportements permettent d'augmenter les chances de l'individu de trouver un partenaire et de se reproduire.

1.2. Le développement du cerveau chez l'homme

Chez l'homme, la plus grande part du développement du cerveau s'effectue in utero mais ce développement se continue majoritairement pendant les deux premières années de vie puis minoritairement jusqu'à la fin de l'adolescence. A deux ans, le cerveau a atteint 80% du poids du cerveau adulte et son développement se poursuit jusqu'à 25 ans (Casey, 2000 ; Counotte, 2011). Les régions du cerveau, nécessaires aux fonctions primaires de survie comme les activités motrice et sensorielles, se développent bien avant les régions temporales et pariétales qui sont impliquées dans le langage de base et l'attention. En particulier les régions hautes d'association impliquées dans les intégrations sensori-motrices et les taches exécutives, comme le cortex préfrontal se développent en dernier. En effet, les zones de hautes intégrations ont besoin des connexions synaptiques entrantes venant des zones d'intégration dites « basses », sensorielles et motrices. Les échanges entre ces différents systèmes changent constamment pendant le développement, ce qui va impacter sur le comportement. Le développement du cerveau est modulé par de nombreux systèmes neurotransmetteurs et de récepteurs comme le glutamate, le GABA, la dopamine, la sérotonine et l'acétylcholine.

1.3. Comparaison relative des âges rat/Homme

Il existe des normes pour comparer les âges chez le Rat et chez l'Homme. Les rats de laboratoire ont une espérance de vie en moyenne de 3 ans tandis que chez les Hommes elle est de 81 ans, en 2012, dans les pays développés (OMS, 2014). Ainsi, une année humaine est égale à deux semaines chez le Rat (13,8 jours rat) en corrélant leur durée de vie entière. Cependant, tout en tenant compte des différentes phases de la vie des rats, y compris du sevrage à la phase de vieillissement, on peut aisément remarquer que les rats ont une enfance brève et accélérée à l'égard des humains. Les rats se développent rapidement pendant l'enfance et deviennent sexuellement matures à environ 40 jours. Les humains, par contre, se développent lentement et n'atteignent la puberté que vers l'âge de 11-12 ans (Pallav, 2013). Ainsi, pour faire un parallèle entre une exposition au CPF chez les enfants et chez les jeunes rats, il faudrait traiter les rats pendant la période qui correspondrait à l'enfance, donc entre environ 7 et 21 jours. Et pour observer le comportement de ces rats durant l'adolescence

correspondant à l'adolescence humaine, il faudrait les observer entre 21 et 50 jours environ (**Fig. 4**).

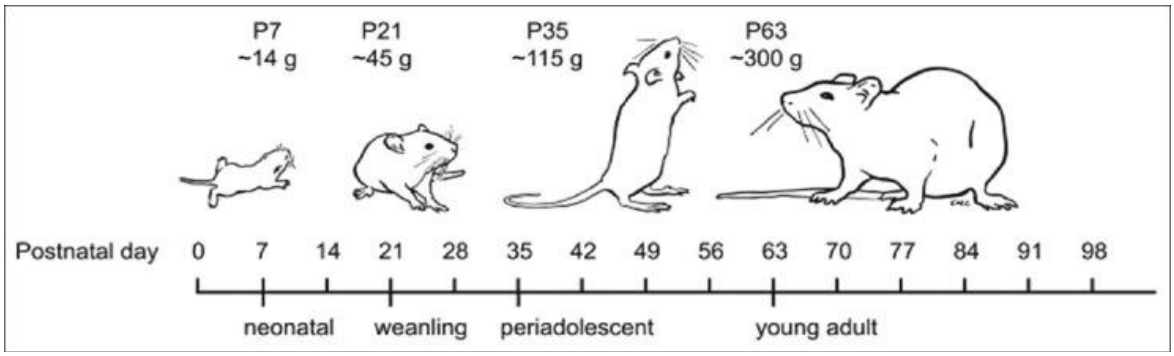


Fig. 4 : Comparaison relative entre l'âge d'un rat et le stade développemental du cerveau humain (Pallav, 2013)

2. La neuroplasticité du cerveau en développement

2.1. Les étapes du développement du cerveau

Le développement du cerveau se déroule en plusieurs étapes cruciales, successives et simultanées, nécessaires à l'obtention d'un cerveau adulte fonctionnel. Initialement les connections synaptiques des neurones sont produites en excès et le nombre de récepteurs neuronaux augmente progressivement (**Fig. 5**, « synaptogenesis », synaptogénèse). Par la suite des processus d'élimination des neurones et des connexions synaptiques en excès, sont mis en place (**Fig.5**, « synapse elimination », élimination de synapses). Ces processus sont dépendants de l'activité neuronale durant le développement et ils permettent la modulation fine des niveaux adultes de connectivité et de signalement du cerveau mature. Par ailleurs, la myélinisation des axones augmente pendant l'adolescence pour permettre d'optimiser la vitesse de traitement des informations. En particulier, les connexions à longue distance, entre les différentes régions du cerveau, ne sont pas encore complètement matures et l'interconnexion entre ces différentes régions n'a pas encore atteint son équilibre. Ainsi pendant le développement du cerveau, des étapes importantes de maturation sont mises en place pour atteindre un cerveau mature fonctionnel.

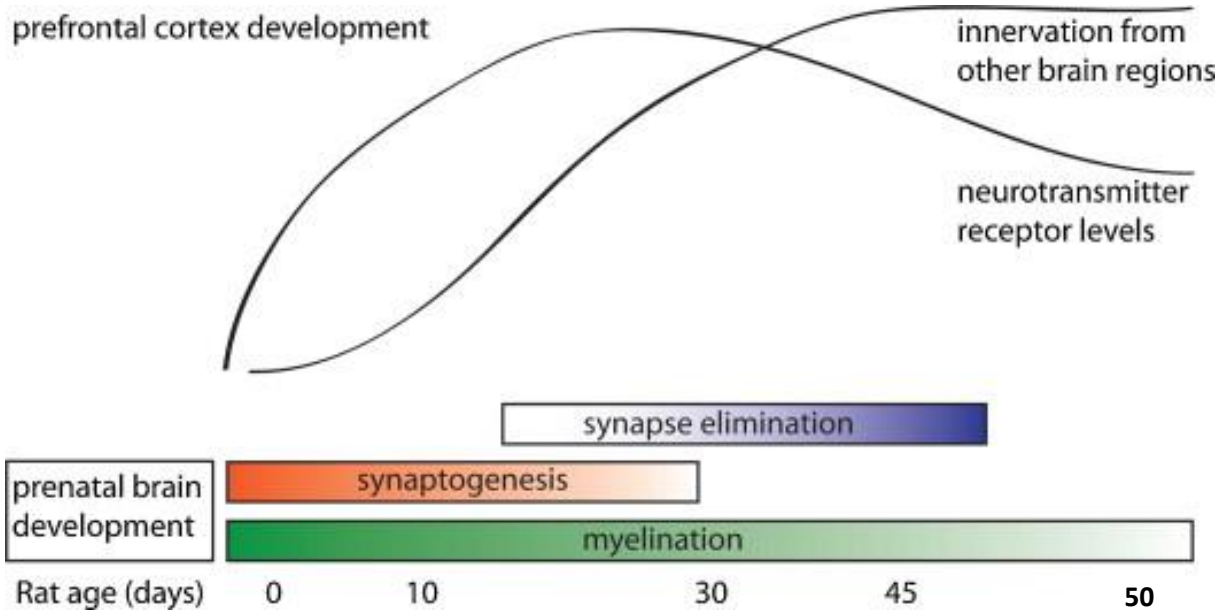


Fig. 5 : Résumé des processus ayant lieu durant le développement du cortex préfrontal de rat. L'adolescence chez le Rat est supposée survenir entre les jours post nataux (PND) 25 à 50 (Counotte, 2011).

2.2.Le développement du cerveau, une période de vulnérabilité

Le cerveau en développement est très sensible à l'intervention d'agents exogènes et des altérations du cerveau mature peuvent être ainsi produites. La neuroplasticité durant le développement permet d'atteindre un stade de maturité du cerveau tel que l'individu exprime une réponse comportementale adaptée à l'environnement qui l'entoure et aux autres individus (Brenhouse, 2011). C'est une période de vulnérabilité où d'importants changements ont lieu et l'exposition à des substances exogènes peut avoir des effets sur le long terme (Counotte 2011). En effet, le cerveau en développement est très sensible aux interventions extérieures et est bien différent de celui de l'adulte. Ainsi, il est concevable qu'un développement anormal du cerveau qui peut provenir de facteurs génétiques et environnementaux (comme les substances chimiques) peut conduire à des altérations durables du fonctionnement du cerveau et donc du comportement (Counotte 2011). La fenêtre classique d'effet tératogène est le premier trimestre de gestation, la fenêtre de vulnérabilité pour les effets neurotoxiques des OP s'étend de l'embryogénèse à la vie postnatale (Slotkin, 2005).

3. La neurotoxicité développementale du chlorpyrifos à plusieurs échelles

Une exposition développementale, à faible dose, au CPF induit des effets persistants sur le cerveau, via son développement, et altère la fonction comportementale à la fois chez les rats juvéniles et chez les adultes. Plusieurs études suggèrent que, lors d'une exposition chronique à faible dose, le mécanisme d'action, encore inconnu, des organophosphorés, et plus particulièrement du chlorpyrifos, ne mettrait pas en jeu l'inhibition de l'acétylcholinestérase, et c'est à ces doses que les enfants sont le plus susceptibles d'être exposés.

3.1. Neurotoxicité à l'échelle cellulaire

L'exposition au CPF, à des doses plus basses que le seuil de toxicité systémique et de l'inhibition de l'AchE du cerveau, ont des effets sur la maturation du cerveau. En effet des inquiétudes sur la neurotoxicité des OP chez l'Homme, dérivées d'études sur des rongeurs, ont montré qu'une exposition prénatale et post-natale au CPF est associée avec des altérations du développement du cerveau. Et ceci a été observé à des niveaux d'exposition bien au-dessous du seuil de toxicité systémique causée par l'inhibition de l'acétylcholinestérase dans le cerveau (Slotkin, 2005). Le CPF provoque des effets sur le développement avec une fenêtre d'exposition très large, allant de la formation du tube neural au stade embryonnaire, jusqu'en post-natal en phase pré-sevrage (Dam, 1999). A l'échelle cellulaire, il a été prouvé qu'une exposition fœtale au CPF altère le développement cellulaire du cerveau, cette altération est visible après la naissance et continue jusqu'à l'adolescence et l'âge adulte (Qiao, 2003, Slotkin 2004). L'équipe de Ricceri, en 2006, a montré que lors d'un traitement en phase néonatale tardive (PND 11 à 14), le CPF entraine une perturbation de la maturation du système nerveux central pendant les phases critiques de maturation. Notamment le développement du cerveau antérieur et particulièrement des voies cholinergiques et les voies inhibitrices et excitatrices. Tout d'abord, il a été démontré que le CPF provoque une altération de l'ADN et de la transcription génétique (Muller 2014; Slotkin, 2005). De plus, le CPF peut induire une perturbation du développement et de la différenciation des cellules neurales (Aldridge, 2005 ; Slotkin, 2004 ; Saunders, 2010), de la synaptogénèse, de l'axogénèse et de la gliogénèse (Dam, 1999 ; Qiao, 2003 ; Slotkin 2005). Ceci entraine des altérations dans la transmission synaptique (Saunders, 2010). Par exemple, dans une étude, à seulement 20% d'inhibition de l'AchE, le CPF compromet les processus basiques du développement du cerveau, la synthèse de l'ADN, l'axogénèse et les cascades de signalisation impliquées dans

l'activité neurotrophique (Dam, 1999). Dans une autre étude, une exposition répétée au CPF (14 jours) a entrainé des altérations persistantes sur le transport axonal dans le cerveau des rats de manière permanente, même après 30 jours d'arrêt d'exposition (Hernandez, 2015). De plus, il a été démontré, après un traitement chronique, sans effets systémiques, que le CPF peut altérer la gliogénèse en provoquant une diminution du nombre de cellules gliales (Ricceri 2006, Roy, 2003). La toxicité du CPF pourrait donc s'étendre jusqu'à l'enfance et l'adolescence au travers de la gliogénèse. C'est un évènement tardif dans le développement embryonnaire chez le Rat et l'Homme et elle se poursuit jusqu'à l'adolescence. Les cellules gliales forment la structure de support pour les neurones, elles fournissent des métabolites, permettent le guidage axonal et la synaptogénèse et enfin elles protègent les neurones immatures des toxiques pour empêcher le stress oxydatif. Les cellules gliales sont plus sensibles au CPF que les neurones et seraient la cible principale (Colborn, 2006). Enfin, à l'échelle du cerveau, une association entre le CPF utilisé à des doses autorisées en agriculture et des altérations de la morphologie du cerveau a été mise en évidence chez l'Homme (Rauh, 2012).

3.2. Neurotoxicité comportementale du chlorpyrifos

Les altérations du développement du cerveau, provoquées par le chlorpyrifos, sont associées à des perturbations comportementales, chez les hommes et les animaux de laboratoire. Ceci suggérant une vulnérabilité comportementale durant la période fœtale et de l'enfance (Berkowitz, 2004).

a. Neurotoxicité comportementale chez l'homme :

La neurotoxicité du chlorpyrifos, à l'échelle comportementale, a été étudiée grâce à de nombreuses enquêtes épidémiologiques. Plusieurs études suggèrent que le CPF est associé à des effets négatifs, à long terme, chez les enfants suite à une exposition environnementale. Ces altérations se retrouvent à l'échelle comportementale et cognitive. On retrouve notamment, dans ces études, une altération, par le CPF, des fonctions motrices, des déficits de mémoire et de Q.I ainsi que le développement de problèmes d'attention et d'hyperactivité (Rauh, 2006, 2011, 2012). Chez les enfants de 7 ans, une exposition prénatale au CPF est corrélée, à des déficits de l'index de mémoire de travail et du QI (Rauh, 2011). Par ailleurs, la toxicité du CPF peut s'exprimer grâce à deux échelles comportementales : l'altération de l'index de développement psychomoteur (IDP) et l'index de développement mental (IDM)

(évaluant le développement sensoriel, moteur et cognitif). Pour une cohorte d'enfants nés à New York, ces index sont corrélés négativement avec l'exposition au CPF. Une exposition à forte dose (>6,17pg/g dans le plasma ombilical) au CPF (pour 51 des 18 enfants de cette étude) induit une diminution de 6,5 points de l'IDP et de 3,3 points du IDM à 36 mois (Lovasi, 2011). De plus, il existe également des arguments significatifs, dans des études épidémiologiques humaines (Ross, 2013), qu'une exposition non aigüe, à faible dose, aux OP peut provoquer des déficits neurologiques et comportementaux prolongés, notamment des problèmes d'attention, de mémoire de travail et de mémoire visuelle. Cet effet a été démontré ailleurs qu'aux Etats-Unis: en Equateur dans une communauté agricole de floriculture, les enfants exposés de manière prénatale aux pesticides ont des déficits moteurs, de coordination et de mémoire, ce qui correspond à un retard de développement intellectuel d'environ 2 ans (Grandjean, 2006). Les experts de l'INSERM considèrent qu'il pourrait exister une association modérée entre l'exposition au CPF et des maladies neuro-développementales (INSERM, 2013) en s'appuyant sur une étude épidémiologique (Rauh, 2006) réalisée chez des enfants de 3 à 7 ans avec une diminution du Q.I. et de la mémoire du travail. Ils émettent tout de même une réserve sur le fait que cette étude a été conduite aux Etats-Unis, chez des enfants appartenant à des minorités ethniques ou à faible revenus qui sont exposés à d'autres substances toxiques, ce qui pourrait interférer avec cette association. L'un des troubles comportementaux suspecté d'être provoqués par le CPF, est l'ADHD (« Attention Deficit Hyperactivity Disorder ») (Rauh, 2006). Ce trouble de déficit de l'attention, caractérisé par de l'hyperactivité et de l'impulsivité (NIMH, 2016). L'ADHD est l'un des problèmes comportementaux le plus fréquent chez les enfants, affectant plus de 2 millions d'entre eux aux USA (National Center for Environmental Health, 1999). Par ailleurs des études suggèrent, que la présence de métabolites du CPF dans les urines est associée à des altérations neuro-développementales (Bouchard, 2010 ; Engel, 2007 ; Rauh, 2006 ; Young 2005). Une concentration prénatale de dialkyle phosphate, un métabolite des pesticides organophosphorés, dans les urines de femmes enceintes, est associé avec un développement intellectuel altéré chez ces mêmes enfants à 7 ans qui ont plus de risque de développer des problèmes d'ADHD (Bouchard, 2011). Chez les enfants empoisonnés aux OP, il a été démontré des déficits d'apprentissage des mots et une plus forte impulsivité (Kofman, 2006).

Cependant, il existe de nombreux biais en épidémiologie si bien que le lien de causalité est difficile à établir, à la différence d'études comportementales en laboratoire.

b. Neurotoxicité comportementale du chlorpyrifos chez les rongeurs

Des perturbations du développement du cerveau sont associées à des altérations comportementales chez les rongeurs exposés au chlorpyrifos, incluant de l'hyperactivité, un déficit de mémoire et des altérations des comportements sociaux et émotionnels.

i. Altération de l'apprentissage et de la mémoire chez les rats:

Une exposition développementale au CPF induit des effets à long terme sur le comportement des rats de laboratoire et sur leurs capacités cognitives. De telles perturbations du développement ont été associées, avec des altérations de l'apprentissage, de la mémoire de travail à court-terme et à long terme (Levin, 2002 ; Aldridge, 2005). Dans une autre étude, des rates ont été traitées avec des doses faibles chroniques de CPF avant et après leur gestation. Les chercheurs ont étudié les effets de cette exposition sur leurs nouveaux nés, grâce à des tests comportementaux. Les nouveaux nés dont les mères ont été traitées au CPF ont montré une diminution de leurs performances de mémoire à court et long terme (Grabovska, 2015). Des effets à long terme sur la mémoire sociale ont été observés, comme la reconnaissance sociale, avec des doses administrées pendant la période postnatale, de PND 11 à 14 (Venerosi, 2006 ; O'Shea, 2006).

ii. Altération de l'anxiété chez les rats

Une exposition périnatale au CPF est associée à une diminution du niveau d'anxiété chez les rats traités. En effet, des études sur l'exposition néonatale au CPF à des doses n'inhibant pas l'AchE (1 à 3mg/kg), ont montré une activité de locomotion spontanée altérée dans l'« open field » (test de mobilité et d'anxiété), et une diminution de l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé (test de l'anxiété) (Ricceri, 2006 ; Aldridge 2005). Par ailleurs, une exposition répétée au CPF en postnatal diminue les comportements associés à la dépression et à l'anxiété chez le Rat (Chen, 2014). Durant les tests courant de dépression (nage forcée, test de nouveauté alimentaire), le CPF a montré avoir des effets anxiolytiques. Dans une autre étude, Savy, en 2015, a montré une diminution du comportement d'anxiété par le test de « marble burying behavior » (le comportement d'enfouissement d'objet qui caractérise l'anxiété chez les rats). Par ailleurs, des chercheurs ont traité des rates avec des faibles doses de CPF de manière chronique, avant et après leur gestation. Ils ont regardé les effets du CPF sur leur nouveaux nés grâce à des tests comportementaux d'anxiété: le test de l' « open field » et le

test de préférence obscurité/lumière. Les nouveaux nés ont montré un plus faible niveau d'anxiété (plus forte mobilité, et hyperactivité) (Grabovska, 2015). Chen, en 2011, a traité des rats de manière répétée au CPF et les a soumis à des tests d'anxiété, dont le labyrinthe en croix surélevé et les a exposés à une source de nourriture nouvelle, source d'anxiété chez les rats. Le CPF a augmenté significativement le nombre d'entrées et le temps passé dans le bras ouvert. Il a diminué la latence des rats à se nourrir à une source de nourriture nouvelle. Ces résultats démontrent une diminution de l'anxiété chez les rats traités au CPF.

L'équipe de Carr, en 2015, a montré également l'effet anxiolytique du CPF grâce au test d'émergence de l'obscurité vers la lumière, qui est un test d'anxiété. Les rats traités de manière répétée, du PND10 au PND16, avec différentes concentrations de CPF (0,5mg/kg, 0,75mg/kg et 1,0mg/kg) par voie orale, à des doses n'inhibant pas l'AChE, ont montré une diminution de leur niveau d'anxiété lorsqu'il est comparé à celui des rats contrôles (**Fig.6**). Les rats non traités au CPF sont restés significativement plus de temps dans l'espace sombre alors que les rats traités ont exploré leur nouvel environnement. Ce test a montré une diminution de l'anxiété des rats traités au CPF.

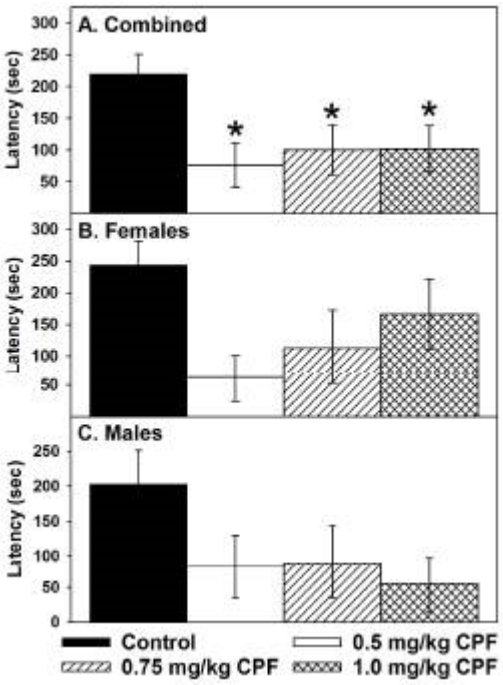


Fig. 6: Latence à sortir du compartiment sombre dans le test comportemental de préférence lumière/ obscurité chez de rats traités a avec de l'huile de maïs (contrôles), 0,5mg/kg, 0,75mg/kg et 1mgkg de chlorpyrifos du PND 10 au PND 16.

4. Des mécanismes encore inconnus lors d'une exposition chronique à faible dose

Plusieurs études avancent un mécanisme d'action de neurotoxicité comportementale indépendant de l'acétylcholinestérase lors d'une exposition chronique à faible dose, trop faible pour provoquer des signes d'intoxication systémique (Dam, 1999 ; Slotkin, 2004). Des études humaines sur des expositions professionnelles aux OP ne réussissent jamais à faire la corrélation entre l'activité de l'AChE dans le sang et les déficits comportementaux (Rohlman, 2011). Des études animales ont démontré que la toxicité développementale ne met pas en jeu d'inhibition substantielle de l'AChE (Carr, 2014), ceci suggérant que cette toxicité pourrait être induite par un mécanisme « non-cholinergique ». Une dose de 5mg/kg de CPF donnée à des rates gestantes pendant la gestation et la lactation

cause une inhibition de 57% de l'Ache dans le cerveau des foetus au 20ème jour de gestation or à faible dose (0,3 à 1mg/kg), aucune inhibition de l'AchE n'a été observée (Maurisseen, 2000). Dans une autre étude, la toxicité systémique et la neurotoxicité développementale de différents OP ont été comparées ; le CPF est l'OP le plus neurotoxique et celui qui a montré le moins de toxicité systémique (Slotkin, 2006). Cette toxicité s'exprime même à des niveaux où l'inhibition de l'AChE n'est pas observée (Aldridge, 2003, 2005a, 2005b). Par ailleurs, certains effets du chlorpyrifos apparaissent à des stades embryonnaires pour lesquels l'AchE n'est pas encore exprimée ou dans des zones du cerveau l'exprimant très peu (INSERM, 2013). Cependant aucune étude n'a réellement démontré quelle est la cible sur laquelle l'insecticide pourrait agir.

5. Une cible privilégiée du chlorpyrifos, le système endocannabinoïde :

Le système des endocannabinoïdes est un système de signalisation dans le cerveau mettant en jeu des neurotransmetteurs et des enzymes de dégradation de ces neurotransmetteurs

5.1.Présentation du système endocannabinoïde

a. Les endocannabinoïdes et leurs récepteurs

Un des mécanismes d'action potentiel, « non-cholinergique », est l'altération du système endocannabinoïde (EC) dans le cerveau. Ce système est constitué de neurotransmetteurs se liant à des récepteurs cannabinoïdes (RCB). Il a été découvert, il y a une vingtaine d'années et est ainsi nommé car il se lie au même récepteur (CB1) que le Δ9-Tetrahydrocannabinol ou THC un des composants de *Cannabis Sativa*. Le système des endocannabinoïdes est composé de deux récepteurs couplés à une protéine G : CB1 et CB2 auxquels se lient les deux principaux endocannabinoïdes : l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Dirk, 2005, Castillo, 2012). Ce sont des médiateurs lipidiques qui sont synthétisés à la demande. Ils ne sont pas stockés dans des vésicules à cause de leur nature lipophilique. Les récepteurs CB1 sont retrouvés en forte concentration dans les neurones terminaux des régions spécifiques du cerveau : l'hippocampe, le ganglion basal, le cortex cérébral, l'amygdale et le cervelet (Dirk, 2005, Akirav, 2011).

b. Les enzymes de métabolisme des endocannabinoïdes

Les deux ECs, l'AEA et la 2-AG, sont métabolisés respectivement par la « fatty acide amide hydrolase » (FAAH) ou l'hydrolase des amides d'acides gras et la monoacylglycerol lipase (MAGL) (Egertova, 2003, Dirk, 2005, Castillo, 2012) (**Fig7. ; Annexe 1.**).

La suite de l'étude va s'intéresser particulièrement à la FAAH, car c'est l'enzyme sur laquelle le CPF a le plus d'effets (Carr, 2011). La FAAH est une enzyme présentant un site actif serine qui sert à hydrolyser et ainsi inactiver un large spectre d'amides lipidiques comme l'anandamine (*N*-arachidonoylethanolamine) (**Fig.7**), le *N*-acylethanolamine (NAE), l'oleamide (*cis*-9,10-octadecanoamide)... C'est une enzyme membranaire d'environ 60 kDa hautement exprimée dans le cerveau, le foie, les reins, les testicules (Long, 2011). La FAAH clive aussi les lipides amides non cannabinoïdes : l'oleoyléhanolamide (OAE) et la palmitoyléthanolamide (PEA) (Bortolato, 2007). Les fonctions biochimiques et physiologiques de la FAAH ont été déterminées en utilisant des inhibiteurs de la FAAH. Le blocage de la FAAH stoppe par exemple, l'hydrolyse de l'AEA et provoque son accumulation. Chez les rongeurs, l'augmentation du niveau d'AEA, généré par l'altération de la FAHH, résulte en des effets dépendants des récepteurs aux cannabinoides, comme un effet anxiolytique (Kathuria, 2003), anti-dépressif (Naidu, 2007), et anti-nociceptif (Cravatt, 2001). Donc la FAAH régule le niveau endogène et l'activité de signalisation de plusieurs classes d'amides lipidiques

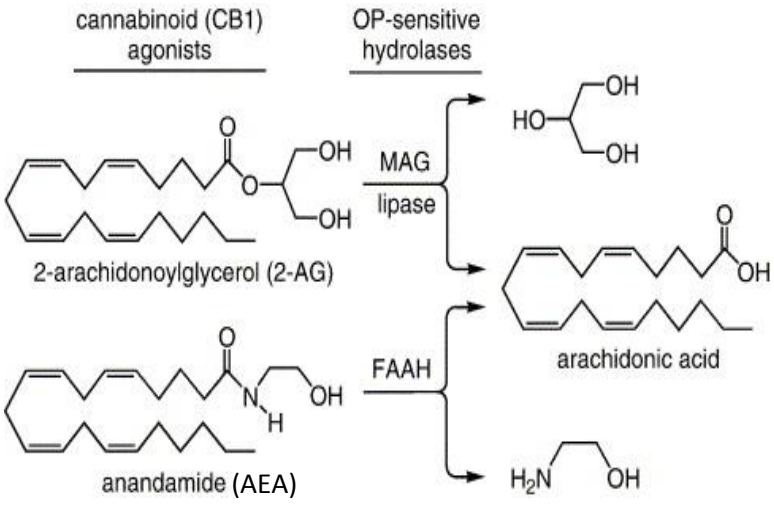


Fig. 7 : Les endocannabinoides et leurs enzymes de dégradation (Quistad, 2005).

5.2. Le rôle de signalisation des endocannabinoides

a. Rôle des endocannabinoïdes à l'échelle cellulaire

Ces ECs jouent plusieurs rôles dans la transmission du message intracellulaires et sont impliqués dans la plasticité neuronale. Via le récepteur RCB1, les ECs modulent

négativement le niveau d'AMP cyclique (second messager intracellulaire) et activent un flux entrant d'ions potassium via les canaux K+ dans les cellules (Dirk, 2005). Ils induisent ainsi une plasticité neuronale sur le court terme. Les récepteurs CB1 sont activés sur une courte période, ce qui implique l'inhibition liée à la protéine G du flux d'ions Ca2+ via les canaux ioniques à Ca2+ (Castillo, 2012) (**Annexe 2**.). La plasticité sur le long terme, quant à elle, implique l'inhibition de l'adényle cyclase et la régulation négative de l'AMP cyclique. Le rôle du récepteur CB2 ne sera pas étudié ici, il intervient dans les cellules du système immunitaire et est retrouvé presque entièrement dans le système nerveux périphérique (Dirk, 2005, Castillo 2012).

b. Rôle des endocannabinoïdes dans la transmission de l'information neuronale

Les ECs servent à la transmission d'informations en présynaptiques dans le cerveau, leur signal peut être modulé par des facteurs exogènes. Ils sont produits à la demande, à la suite d'un signal post-synaptique. Les ECs traversent alors les synapses en sens inverse pour se lier aux récepteurs CB1 au niveau du neurone en présynaptique. Ils activent ainsi les récepteurs CB1 et modulent la neurotransmission en inhibant le relargage de neurotransmetteurs au niveau des neurones présynaptiques du système nerveux central et périphérique (Liu, 2014 ; Castillo, 2012) **(Annexe 2**.). Le système des ECs régule la libération de nombreux neurotransmetteurs comme l'acétylcholine, le GABA, le glutamate, la sérotonine, la dopamine… Les ECs produisent un signal rétrograde qui modifient la plasticité synaptique sur le long et le court terme, au niveau de synapses à la fois excitatrices et inhibitrices (Castillo, 2012). La plasticité du système des ECs se traduit par la régulation du nombre et de l'activation des récepteurs CB1 présents dans les synapses et par la production et la dégradation des ECs (Castillo, 2012). Ce signal synaptique peut être modulé par des facteurs exogènes. En effet, une seule exposition in vivo au THC a aboli pour quelques jours le signal rétrograde des ECs (Mato, 2004). Cet effet est associé à l'altération de l'efficacité des récepteurs CB1 sans modification du nombre total de liaisons enzymes-récepteurs. Une exposition prolongée aux agonistes des ECS, chez l'Homme et l'animal, résulte en une tolérance comportementale qui est attribuée à une désensibilisation et une internalisation des récepteurs aux ECs (Wu, 2008). Il existe par ailleurs un changement développemental du système des ECs (Harkany, 2008) avec une expression plus faible des récepteurs CB1 dans

les synapses excitatrices des cerveaux adultes par rapport à celles des cerveaux plus jeunes (Kawamura, 2006).

c. Rôle des endocannabinoïdes dans le développement du cerveau

Les ECs jouent également un rôle important dans l'orchestration du développement normal du cerveau ; ainsi une altération de ce système pourrait conduire à des modifications du fonctionnement normal du cerveau sur le long terme. Ils sont notamment impliqués, au cours de la neurogénèse, dans le contrôle de la formation des synapses, la prolifération des cellules souches neurales, la migration et la différentiation phénotypique des neurones immatures (Fernandez-Ruiz, 1999 ; Trezza, 2012) (**Annexe 3.**). Ils entrent donc en jeu dans la mise en place de l'organisation cellulaire du cerveau durant la vie pré et post-natale (Trezza, 2012). L'administration d'ECs a des effets favorables sur la neurogénèse. Par example, l'AEA administrée de façon chronique et non aigüe, favorise la neurogénèse dans l'hippocampe chez l'embryon et le rat adulte. Par ailleurs, les neurones souches et les cellules pro génitrices expriment les récepteurs CB1 aux cannabinoides, indiquant que les cannabinoides pourraient agir sur ces récepteurs pour réguler la neurogénèse (Jiang, 2005). Par ailleurs, il a été mis en évidence des voies de signalisation impliquant l'activation des récepteurs CB1, contribuant à la diversification neuronale dans le cerveau en développement (Harkany, 2008). Les effets d'une modification du signal des ECS sont donc potentiellement observables sur le long terme si le développement normal du cerveau est altéré. Ainsi, si un traitement est effectué en périnatal, les conséquences pourraient s'observer à l'adolescence et à l'âge adulte.

6. Rôle des endocannabinoïdes sur le comportement

Le système des endocannabinoïdes régule de nombreuses fonctions physiologiques chez l'adulte comme la cognition, la mémoire, la douleur, l'appétit et la motricité (Castillo, 2012). Mais le système des endocannabinoïdes est également un substrat important dans le contrôle des comportements reliés aux émotions tels que l'anxiété et les comportements sociaux.

6.1. Régulation de l'émotivité par les endocannabinoïdes

a. Définition de l'émotion et de l'émotivité

L'émotion est un mécanisme d'adaptation culturel et psychobiologique qui permet aux individus de réagir avec flexibilité et dynamisme à leur environnement. Les émotions sont

exprimées quand un évènement pertinent touche l'organisme, en ayant un impact direct sur ses besoins, buts et son bien-être. En général, la pertinence des évènements est déterminée selon des critères comme la nouveauté, le fait que l'évènement soit inattendu, son caractère intrinsèque plaisant ou déplaisant et sa cohérence en motivation, c'est à dire s'il est favorable à satisfaire le besoin, atteindre le but (Scherer, 2009). La régulation individuelle des émotions dépend d'échanges d'informations perpétuels entre les prédispositions biologiques et les enjeux de l'environnement. Les émotions impliquent de nombreux composants du système nerveux autonome, hormonal, comportemental et cognitif. Des signes physiologiques de l'émotion s'observent par des changements de l'activité du système nerveux autonome comme des changements dans la fréquence cardiaque, la tension des muscles, la sudation et des changements métaboliques. L'émotivité est le composant observable du comportement et de la physiologie de l'émotion. C'est la mesure de la réactivité émotionnelle d'un individu à un stimulus. La stimulation environnementale régule la réactivité émotionnelle individuelle. L'adolescence est particulièrement sensible à l'influence environnementale (Macri, 2012). Les régions du cerveau comme l'hippocampe et le cortex, sont directement impliqués dans la régulation du comportement émotionnel. De plus les états émotionnels sont coordonnés par l'amygdale dans le cerveau ; celle-ci fait partie du système limbique près des lobes temporaux et est impliquée dans la cascade physiologique contrôlant le comportement émotionnel (Scott, 2011 ; Wei, 2015). Les tests expérimentaux utilisés chez les animaux de laboratoire permettant de mesurer l'anxiété se sont peu à peu développés et le principal test est à ce jour le labyrinthe en croix surélevé, que nous allons aborder par la suite (**Annexe 4**, **8**.).

b. Rôle des endocannabinoïdes dans l'émotivité et l'anxiété

Les endocannabinoïdes sont impliqués dans la régulation de l'émotivité à l'environnement et, par conséquent, dans la régulation du niveau d'anxiété. Tout d'abord, les ECs sont libérés à la demande ; ils peuvent donc être à la base d'adaptation à des changements environnementaux (comme des évènements stressants). La modulation de l'activité synaptique par la libération de neurotransmetteurs (via l'activation du CB1R) permettrait au système des ECs de réguler l'activation neuronale dans les réseaux liés à l'émotion (Wei, 2015). En effet, la densité de récepteurs CB1 est particulièrement forte dans les structures corticales et limbiques. Ceci montre bien l'implication de ces récepteurs dans la régulation de la réactivité émotionnelle, donc dans le contrôle de l'émotivité (Trezza, 2012). Le système

des ECs régule l'axe hypothalamus-hypophysaire-surrénalien qui est impliqué dans la réponse appropriée à des évènements stressants (Valverde 2005). L'augmentation du niveau des endocannabinoïdes suite à un évènement stressant ou aversif à la base de la réponse émotionnelle, permettrait de faire face à cet évènement. Ainsi l'individu pourrait s'adapter à toutes nouvelles situations dans un nouvel environnement, en particulier s'il est aversif. Par conséquent, les rats ayant un niveau d'émotivité plus bas seront moins anxieux face à un environnement aversif. Le modèle animal de l'anxiété permet de mesurer un changement dans la tendance des individus à éviter des situations aversives inhérentes. Ainsi une diminution de l'évitement de ces situations aversives indiquerait une diminution de l'anxiété (effet anxiolytique). Par exemple, les situations aversives peuvent être les aires très éclairées, les aires ouvertes (comme dans le test de l' « open field »), les aires élevées (comme dans le labyrinthe en croix surélevé), les interactions sociales avec un partenaire non familier, un environnement inconnu. Si des rats traités au CPF évitent moins ce genre de situations aversives par rapport aux rats contrôle, ceci indiquerait une diminution de leur émotivité à un environnement aversif et ainsi une diminution de leur niveau d'anxiété.

c. Effets anxyolitiques des endocannabinoïdes

La réponse émotive, permet à l'animal de s'adapter à un environnement changeant. L'anxiété est un comportement adaptatif à des stimuli potentiellement dangereux qui pourraient menacer l'intégrité de l'individu. Le système des EC, agissant par le biais des récepteurs CB1, module la réponse à un environnement changeant, particulièrement lorsqu'il est aversif ; il module donc également le niveau d'anxiété.

i. Délétion génétique des récepteurs CB1

Le modèle souris ayant une mutation sur le gène codant pour le RCB1 (knockout pour le RCB1) a été utilisé dans de nombreuses études sur le rôle de ce récepteur dans la régulation de l'émotivité. Les effets anxiogéniques de la délétion du RCB1 ont été répliqués avec différentes procédures de test de l'anxiété. Les souris déficientes en récepteur CB1, présentent des altérations comportementales qui peuvent être reliés aux symptômes dépressifs humais (anhédonie, réponse exagérée au stress) et montrent des phénotypes anxieux. Il a été montré que les souris knockout pour le RCB1 sont plus anxieuses que les souris non mutantes dans le test de l' « open field » (Maccarorone, 2002) et dans le test de préférence lumière/obscurité (Martin, 2002, Maccarorone, 2002). Ces résultats ont seulement été

retrouvés chez les souris adolescentes. Par ailleurs, l'équipe de Haller, en 2002, a montré que les souris knockout pour le RCB1, ont un niveau d'anxiété plus élevé dans le labyrinthe en croix surélevé.

ii. Effets des agonistes et antagonistes au récepteur CB1 sur le comportement émotif

L'utilisation de molécules agonistes ou antagonistes au RCB1 a permis de comprendre l'implication de ce récepteur dans la modulation de l'émotivité et de l'anxiété. Il a été démontré que l'activation de ce récepteur, via une administration d'AEA, a eu des effets anxiolytiques chez le rat modèle pour un stress chronique moyen (Bortolato, 2007). De même, l'équipe de Ribeiro, en 2009, a montré que de l'AEA administrée à des rats, a diminué leur niveau d'anxiété. En effet, ce traitement a augmenté le temps passé dans le bras ouvert du labyrinthe en croix surélevé et dans la zone ouverte de l' « open field ». Dans une autre étude, une inhibition des ECs a augmenté le stress et l'anxiété, tandis qu'une augmentation dans le signal des ECs diminue l'anxiété des rats. Le pouvoir anxiolytique de l'AEA pourrait être dû à son interaction avec le RCB1 (Kirav, 2011; Trezza, 2012). En effet l'action anxyolitique de l'AEA a été bloquée grâce à l'utilisation d'un antagoniste sélectif au RCB1. Par ailleurs, un agoniste exogène, comme le THC, provoque des effets comportementaux analgésiques ou anxiolytiques. Cependant, pour le THC, contrairement aux cannabinoïdes endogènes, il existe un grand nombre d'effets secondaires comme l'hypo motilité, l'hypothermie et des altérations cognitives (Namura, 2008). Le THC administré durant l'adolescence a été relié à des altérations dans la réactivité émotionnelle pendant l'âge adulte et il est corrélé avec une augmentation d'un facteur cinq du risque d'être dépressif et anxieux pendant l'âge adulte (Patton, 2002).

iii. Effets de l'augmentation du signal de l'anandamine à travers l'inhibition de la FAAH

L'équipe de Kathuria (2003) a montré que l'inhibiteur (URB597) de l'enzyme FAAH, métabolisant les ECs, augmente fortement le niveau d'AEA dans le cerveau mais pas celui de 2-AG. Cet inhibiteur a des effets anxiolytiques chez les rats nouveau-nés en diminuant leurs vocalisations ultrasoniques et en augmentant leur exploration sur le labyrinthe surélevé. Les auteurs ont conclu que l'AEA participe à la modulation des états émotionnels et présentent l'inhibition de la FAAH comme une approche innovante de la thérapie anxiolytique.

iv. Effets de l'inhibition de la FAAH sur le modèle de l'anxiété :

Le signal des ECs peut être augmenté par l'administration d'inhibiteur pharmacologique de l'enzyme FAAH. Cette inhibition empêche la dégradation des ECs qui ont été libérés. Cette accumulation d'ECs, et notamment d'AEA, augmente et maintient les effets des AEA où son action est déjà exercée. Il a été avancé que l'augmentation des effets de l'AEA agit sur un sous-ensemble de RCB1 qui est normalement engagés dans le contrôle des émotions (Piomelli, 2006). En effet, il a été démontré qu'un traitement avec l'inhibiteur de la FAAH (URB597) diminue l'anxiété sur le labyrinthe en croix surélevé chez les rats (Patel, 2006 ; Moreira, 2008, Kathuria, 2003 ; Patel 2006 ; Scherma 2009). Ainsi l'inhibition de la FAAH a une activité anxiolytique chez le Rat.

d. Résultats contradictoires et effets des stimuli environnementaux sur l'inhibition de la FAAH

Selon le protocole expérimental utilisé, l'inhibition de la FAAH peut avoir, soit des effets anxiolytiques, soit des effets anxiogéniques. Pour observer une altération significative du niveau d'anxiété chez des rats, en utilisant l'inhibiteur de la FAAH, il faudrait utiliser des conditions expérimentales aversives. En effet, il a été trouvé des résultats contradictoires sur les effets anxyolitiques des endocannabinoïdes, selon la dose utilisée, la durée de traitement et selon les conditions expérimentales du test effectué (Moreira, 2010). Des données in vivo avancent une modulation dose dépendante de l'anxiété par les ECs et l'importance du contexte environnemental. Les hautes et faibles doses ont souvent des effets contraires, en effets, des faibles doses produisant des effets anxiolytiques et les doses élevées, des effets anxiogéniques (Moreira, 2010 ; Akirav 2011). Haller, en 2009, a démontré que l'inhibiteur de la FAAH, l'URB597, ne diminue pas l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé sous des conditions peu aversives (chambre familière, sous faible éclairage, manipulation des rats avant l'expérience). Par contre l'inhibiteur a un effet robuste anxiolytique quand l'aversivité de la chambre de test est augmentée en enlevant l'habituation et en employant une forte intensité lumineuse de la chambre de test. Par ailleurs, l'effet anxiolytique de l'URB597 est aboli par un antagoniste du récepteur CB1 (AM251) (Haller, 2007; Scherma, 2009). De plus, Haller, en 2004, a démontré que la délétion du gène CB1 avait un effet anxyogénique seulement lorsque que les souris knock-out sont testées sous de la lumière intense. Ceci prouve que la modulation de cet effet est contrôlée par les récepteurs CB1 (Haller, 2009). Les

effets contradictoires observés ont été expliqués par la distribution des RCB1 dans le cerveau. En effet, ces récepteurs sont retrouvés dans des régions du cerveau impliquant des mécanismes glutamatergiques et GABA-ergiques qui jouent des rôles opposés sur l'émotion et particulièrement sur l'anxiété (Haller, 2009 ; Moreira, 2010). Des effets contradictoires, dépendant de l'aversivité du test, ont été également observés sur le comportement exploratoire des rongeurs (le labyrinthe en croix surélevé, l'open field, le test de préférence obscurité/lumière) (Jacob, 2009). La familiarité du partenaire de jeu lors du test d'interaction sociale pourrait également moduler ce comportement d'anxiété. En conclusion, des conditions aversives sont nécessaires à l'observation des effets anxiolytiques de l'inhibition de la FAAH.

6.2. Régulation du comportement social et du jeu par les endocannabinoïdes

L'activation du système des endocannabinoïdes favorise le comportement social des rats et notamment le jeu entre deux individus.

a. Observations du comportement social : le jeu

Le jeu n'a pas une haute priorité par rapport aux autres processus cognitifs ; il a cependant une haute valeur de récompense, et il est essentiel au développement social normal chez l'adulte. Il n'a pas lieu ou très rarement en présence de conditions environnementales aversives. Le jeu se déroule quand les besoins primaires de l'animal sont comblés et que l'animal se sent en sécurité. Le jeu a un impact important sur le développement du cerveau, sur la santé et le bien-être. Chez l'homme, il y a actuellement des discussions pour comprendre comment le jeu peut aider les enfants atteints de maladies psychiatriques et notamment atteints de l'ADHD. En effet, les enfants privés de jeu sont plus sensibles à ce genre de pathologies. Le jeu apparait spontanément à partir de 18 jours chez le Rat et augmente peu à peu pour atteindre un haut niveau tout au long de l'adolescence (Syivi, 2011). Le jeu permet au rat d'ajuster son comportement pour faciliter sa survie et l'émergence de ses compétences sociales. Le comportement de jeu est la forme la plus précoce du comportement social non dirigé vers la mère apparaissant pendant l'ontogénèse chez les espèces mammifères ; il a été défini par : « une activité locomotrice, observée en post-natal, qui apparait n'avoir aucun bénéfice immédiat pour le joueur, dans lequel les comportements locomoteurs ressemblent à ceux utilisés dans des contextes fonctionnels ». Les actes moteurs constituant le jeu ont une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : exagération des

mouvements, répétitions d'actes moteurs, fragmentation et désordonnément des séquences motrices (Vanderschuren, 1997). Le jeu contient des schémas comportementaux reliés à des comportements sociaux sexuels ou agressifs. La composition du jeu a été décrite dans de nombreuses études (Trezza 2011, 2012 ; Vanderschuren, 1997) et on y retrouve les comportements suivants :

- « Pouncing » : donner des coups de museau sur la nuque du partenaire avec le bout du museau, associé à un mouvement de frottement
- « Boxing/wrestling » : se mettre sur ses postérieurs en poussant et en donnant des coups de patte au partenaire
- « Pinning » : la posture la plus caractéristique du jeu social, est définie quand l'un des individus est allongé dorsalement au sol, l'autre animal se tenant au-dessus de lui dans une position de dominance
- « Chasing » si un des animaux s'enfuit rapidement et son partenaire de jeu le poursuit
- « Exploration sociale » : renifler ou lécher une partie du corps du partenaire
- « Social grooming», ou le toilettage social, suit le pouncing ou le pinning ; si l'animal ne s'enfuit pas et s'il ne se met pas sur le dos. Ceci consiste à mâcher ou lécher la fourrure de son partenaire, en plaçant ses antérieurs sur le dos ou le cou de celui-ci.
- « Crawling over et under » : consiste à passer au-dessus ou au-dessous du partenaire

Le jeu débute lorsqu'un individu approche et sollicite un autre individu (« pouncing ») moment durant lequel le rat qui sollicite l'autre, essaye de mordiller la nuque de son adversaire ; A partir de là, « chasing », « boxing wrestling », » social grooming » ou « pinning » suivent.

L'animal préfère jouer dans les endroits abrités peu éclairés et familiers. Le jeu est supprimé sous de la lumière vive, en effet, le jeu est associé avec un fort risque de prédation et il est accompagné par un niveau bas d'attention à l'environnement ; les comportements sociaux et l'exploration diminuent. Les résultats sont les mêmes dans un milieu non familier avec une absence de jeu (Vanderschuren, 1997). L'isolement à court terme, avant le test des interactions sociales, augmente considérablement la fréquence des jeux et des comportements sociaux chez les rats jeunes et adultes (Siviy, 2011). Par exemple la fréquence de « pinning » est proportionnelle au temps d'isolement avant le test. Donc en conditions expérimentales

aversives (milieu de test très éclairé, ouvert, en hauteur, non familier), le comportement de jeu n'est normalement pas ou très rarement observé chez des rats.

b. Substrats neuronaux du comportement social : le jeu

Au point de vue anatomique, le jeu est contrôle par plusieurs aires cérébrales. Le premier circuit neuronal sollicité pour le jeu chez le Rat, inclut le noyau thalamique intra-laminaire, le cortex frontal et le striatum, l'hypothalamus ventral et le tectum profond. D'autres aires neuronales peuvent interagir comme l'amygdale. Par exemple, il a été prouvé que la taille de l'amygdale est corrélée à la quantité de jeu social. Le cortex pré-limbique, le cortex orbito-frontal médial et le noyau accumbens sont aussi très importants (Vanderschuren, 2016). Les substrats neuronaux les mieux connus sont l'acétylcholine, les catécholamines, la dopamine, sérotonine, noradrénaline, les opioïdes et l'ocytocine. Ils ont un rôle dans l'intégration de stimuli environnementaux et sensoriels. Les endocannabinoïdes endogènes ont également une influence modulatrice positive sur le jeu (Vanderschuren 1997). Il y aurait donc des interactions complexes entre tous ces systèmes dans la régulation du jeu.

c. La régulation du comportement social par les endocannabinoïdes

Le système endocannabinoïde du cerveau joue un rôle crucial dans le traitement des émotions. L'AEA module positivement le comportement social chez les rats adolescents. En effet, l'augmentation du niveau d'ECs, dans le cerveau, amplifie son signal et facilite le jeu (Zanetti 2011 ; Trezza, 2008, 2009, 2015 ; Wei 2015). La modulation du jeu social se situe dans des régions impliquées dans l'émotion et la motivation : le jeu social augmente le niveau d'AEA dans l'amygdale et le noyau accumbens dans lequel se trouve de nombreux RCB1 (Wei, 2015). Le jeu augmente ainsi la phosphorylation des récepteurs CB1 dans l'amygdale, ceci entrainant une augmentation du signal de l'AEA dans cette région du cerveau, et, par conséquent, une augmentation du jeu social. De plus, l'infusion du cerveau avec de l'inhibiteur de la FAAH (URB597) augmente le jeu social et incidemment, la concentration d'AEA dans l'amygdale, ceci sans changement dans la synthèse d'AEA (Trezza, 2012). Il a été prouvé que l'administration de composés qui prolongent l'action des ECs endogènes dans les synapses actives, favorise le jeu, tandis que des agonistes directs des cannabinoïdes le diminuent considérablement (Siviy, 2011). Puisque les ECs sont synthétisés et libérés à la demande, cela suggère qu'un sous-ensemble de synapses avec des récepteur CB1 aux

cannabinoïdes sont activés durant le jeu. La rencontre avec un nouveau partenaire chez les rats adolescents provoque l'activation du système des ECs (le niveau d'AEA augmente) et semble important pour faire face à un nouveau contexte social (Marco, 2011). Il se pourrait également que l'activation du système des ECs, diminue le niveau d'anxiété des rats, et ceci leur permettrait d'être moins attentifs à leur environnement pour pouvoir déclencher le comportement de jeu.

7. Altération du système des endocannabinoïdes par le chlorpyrifos

Une des cibles préférentielles du chlorpyrifos, lors d'une exposition développementale à faible dose, qui expliquerait les altérations comportementales serait le système des EC dans le cerveau.

Il a été démontré que l'activation du système des EC durant une exposition développementale à des cannabinoïdes exogènes, comme le Δ9-Tétrahydrocannabinol ou THC, l'ingrédient psychoactif de la *marijuana*, altère la maturation de nombreux systèmes de neurotransmissions, dont le système des ECs, et provoque un développement anormal du cerveau et des comportements altérés (Garcia, 1999). Le récepteur dans le cerveau pour le THC, est le RCB1. Ainsi il serait possible que l'exposition développementale à tout produit chimique qui altère le niveau d'EC puisse conduire à un développement anormal du cerveau et à des altérations du comportement. Plusieurs études ultérieures, sur des animaux adultes, ont reporté qu'une exposition au CPF induit une inhibition des enzymes qui métabolisent les EC dans le cerveau (FAAH et MAGL), et une accumulation de AEA et de 2-AG dans celui-ci (Quistad, 2001; 2002; 2006; Liu, 2013, 2015). La concentration en AEA par rapport à celle en 2-AG est plus importante après le traitement au CPF dans plusieurs études. L'équipe de Carr, en 2011, a traité des rats juvéniles de 10 jours, pendant 7 jours, avec différentes concentrations de CPF (1mg/kg, 2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg), correspondant à de faibles doses, pendant la période durant laquelle leur cerveau se développe. Il a été mesuré que 4h suivant la dernière administration, les enzymes FAAH, MAGL et AchE sont inhibées dans le cerveau antérieur à toutes les doses de CPF administrées. A la plus faible dose (1,0mg/kg), l'inhibition de l'activité de la FAAH est la plus importante ainsi que la quantité d'AEA en comparaison de l'activité de l'AchE, de la MAGL et de la quantité de 2-AG. Dans d'autres travaux antérieurs, la FAAH avait été inhibée par le CPF de 88-91%, la MAGL de 35-50% (CPF=280mg/kg) (Liu, 2013), la FAAH de 95% et la MAGL de 37% (CPF=5mg/kg) (Carr, 2011). Donc le CPF s'est montré plus actif sur la FAAH par rapport à la MAGL (Carr, 2011 ;

Liu, 2013). Ainsi, à de faibles concentrations de CPF, il existe un point où l'inhibition de la FAAH et le taux d'AEA sont plus élevés, sans observer d'effet mesurable sur l'activité de l'AchE, de la MAGL, et sur le taux de 2-AG. Une autre étude, du même auteur, a encore diminué cette concentration minimale à 0,5mg/kg et les mêmes paramètres ont été mesurés 4h et 12h après le dernier traitement (Carr, 2013). On a observé les mêmes résultats, avec, à faible dose, une inhibition de l'activité de la FAAH et une accumulation de l'AEA. Donc la cible principale du CPF serait la FAAH et provoquerait majoritairement l'accumulation d'AEA. Cependant, il n'est pas sûr que le niveau d'accumulation de l'AEA, pendant le développement, puisse mener à des altérations fonctionnelles plus tard. Il est avéré, expérimentalement, qu'une exposition développementale à faible dose au CPF induit des effets persistants sur le cerveau et altère la fonction comportementale à la fois chez les rats juvéniles et chez les adultes. Mais le mécanisme à la base de ces effets reste inconnu.

B. Objectifs de l'étude expérimentale

Mon stage de recherche, au cours de ma troisième année de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse, s'est déroulé au laboratoire de neurosciences de l'Ecole Vétérinaire de l'Université d'Etat du Mississipi aux Etats-Unis. Ce stage de trois mois, sous la direction du Dr Carr, s'inscrivait dans un plan de recherche sur 4 ans.

Le but de ce projet est d'améliorer la compréhension du mécanisme à la base de la toxicité développementale des insecticides OP tels que le CPF. Bien que des études ultérieures aient rapporté des effets toxicologiques au niveau de nombreux systèmes de neurotransmission après une exposition développementale à faible dose aux OP, une cible précise n'a pu être identifiée ; une cible « non cholinergique » à laquelle les OP ou ses métabolites puissent se lier. Et c'est particulièrement vrai à des niveaux d'exposition qui n'induisent pas d'inhibition de l'AchE, ce qui se rapproche le plus du scénario d'exposition de la vie courante. En se basant sur ces études préliminaires, l'hypothèse avancée est que le dysfonctionnement neurologique induit par une exposition développementale, à faible dose, au CPF passe par une altération de la fonction du système des ECs et plus particulièrement par l'inhibition de la FAAH. Cette inhibition induirait, plus tard, des altérations comportementales chez les rats adolescents. Après une exposition, à faible dose, au CPF, l'inhibition de la FAAH est serait un marqueur de toxicité plus sensible que l'inhibition de l'AchE. Le laboratoire d'accueil s'est donc ensuite focalisé sur l'étude de l'inhibition de la FAAH. L'objectif de cette recherche est de déterminer les effets d'une exposition développementale, à faible dose, au

CPF, en approfondissant l'effet sur l'émotivité et en étudiant également son effet sur le comportement social de rats adolescents. En incluant un inhibiteur spécifique de la FAAH (PF-04457845), il a été déterminé comment les effets sur le comportement observés pourraient être dus à l'inhibition de la FAAH. Cette étude est basée sur l'hypothèse d'un nouveau mécanisme de neurotoxicité du CPF, à faible dose. L'objectif final est d'extrapoler du rat, exposé au CPF, aux enfants lorsqu'ils sont exposés à ce pesticide, plus sensibles à ce risque de toxicité. Les effets de cette neurotoxicité, à faible dose, sur le long terme, sur leur comportement, notamment durant leur adolescence sont particulièrement pertinents lors d'une exposition quotidienne. Les rats ont donc été traités au CPF, à de faibles doses n'inhibant pas l'AchE, pendant la période qui correspond à l'enfance humaine, lorsque leur cerveau est encore en développement. Puis, leur comportement a été testé pendant la période qui correspondrait à leur adolescence.

1. Résultats préliminaires antérieurs à l'étude

Les premières recherches du laboratoire d'accueil ont porté sur les effets du métabolisme des endocannabinoïdes sur le cerveau en développement après une exposition répétée à des faibles doses de CPF. Les chercheurs ont démontré qu'une exposition développementale au CPF inhibe la FAAH plus fortement que l'inhibition de l'AchE et la MAGL (Carr, 2011). Ils ont ensuite effectué une étude sur la cinétique de l'inhibition de la FAAH et ont démontré que le pic de l'inhibition de la FAAH avait lieu 12h après la dernière administration de CPF (Carr, 2013). Cette inhibition était accompagnée de l'accumulation d'AEA et de 2-AG mais les concentrations d'AEA étaient beaucoup plus élevées que celles de 2-AG (Carr, 2013). Puisque toutes les doses de CPF utilisées précédemment ont induit l'inhibition de l'AchE, l'équipe du Dr. Carr a ensuite testé une dose plus faible qui n'a aucun effet sur l'activité de l'AchE. Il a été observé une inhibition significative de la FAAH et une accumulation d'AEA mais aucun changement dans le niveau de 2-AG (Carr, 2014). Dans l'étude la plus récente, la même équipe de chercheur a montré que des rats exposés, avant sevrage, à des doses de CPF (0,5 et 0,75 mg/kg) qui n'inhibent pas l'AchE mais qui altèrent le métabolisme des endocannabinoides, ont manifesté une diminution de leur anxiété lorsqu'ils sont testés pendant la période post sevrage (9 jours après la dernière administration de CPF). D'autres études ont déjà rapporté les effets d'une exposition développementale au CPF sur le comportement, notamment l'anxiété, en utilisant le labyrinthe en croix surélevé (Aldridge, 2005; Ricceri, 2006) et sur le comportement d'anxiété relié au comportement social (Ricceri,

2003; Venerosi, 2006; 2008; 2010; 2015). Mais les chercheurs de cette équipe ont été les premiers à démontrer une altération du niveau d'anxiété à des doses qui n'inhibent pas l'AchE. Le premier test comportemental qu'ils ont utilisé, a été le test d'émergence, dans lequel il a été mis en évidence le conflit pour l'animal pour choisir entre explorer un environnement nouveau et éviter un espace ouvert très éclairé. Cependant, un seul test comportemental ne donne pas un aperçu assez précis de l'émotivité de l'animal, et tester les rats confrontés à plusieurs tâches comportementales est nécessaire pour obtenir une image la plus représentative possible de l'émotivité de l'animal en réponse à un nouvel environnement. Il est possible que cette diminution de réactivité émotionnelle puisse également altérer leur comportement social. En effet ces deux notions sont liées; si le rat se montre trop émotif, trop sensible à son environnement, il n'exprimera pas de comportement social. Et au contraire, s'il ne l'est pas assez, le comportement social sera facilité.

2. Etude de l'émotivité et de l'anxiété au travers de nouveaux tests comportementaux

L'objectif global de cette nouvelle étude est d'approfondir les effets d'une exposition développementale à faible dose sur le comportement d'anxiété en ajoutant de nouveaux tests comportementaux : « l'open field » (champ ouvert) et « l'elevated plus maze » (le labyrinthe en croix surélevé) et le test d'interactions sociales. Ces trois tests incluent des mesures de comportements liés à l'anxiété (Ramos, 2008 a et b; Cryan & Sweeney, 2011). Un protocole intégrant plusieurs tests comportementaux mesurant l'anxiété est plus fiable, complet et rapide, pour évaluer les comportements liés à l'anxiété et ses composantes (Ramos, 2008). De plus, les tests comportementaux ont inclus deux conditions complémentaires. Premièrement, il a été démontré que lors d'une altération du métabolisme des ECs, par l'inhibition de la FAAH, les effets anxiolytiques sont observables lorsque les conditions de test sont rendues plus aversives par la non-habituation et l'augmentation de l'intensité lumineuse dans la zone de test (Naidu, 2007; Haller, 2009). Ainsi, pour tous tests comportementaux, les dispositifs sont fortement éclairés pour rendre le test plus aversif et aucune habituation n'est effectuée préalablement. Ensuite, en complément des trois dosages de CPF qui ont été utilisés préalablement dans le test d'émergence, il a été ajouté un groupe de traitement additionnel qui va être exposé à un inhibiteur spécifique de la FAAH (PF-04457845) en utilisant un paradigme expérimental similaire que celui utilisé pour le CPF. Ceci avait pour but de déterminer que les effets comportementaux observés après une exposition développementale au CPF étaient similaire à ceux induits par l'inhibition de la FAAH durant le développement.

C. MATERIELS ET METHODES

1. Produits chimiques utilisés:

Le chlorpyrifos (>99%) utilisé a été fourni par la Dow Elanco Chemical Company (Indianapolis, IN). L'inhibiteur de la FAAH utilisé est le PF-04457845; il a été commandé à Larom MedChem Express (Monmouth Junction, NJ). Tous les autres produits chimiques ont été achetés à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2. Animaux:

Les adultes mâles et femelles, de la race Sprague Dawley ont été élevés pour obtenir des portées (CD IGS; Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Les animaux ont été hébergés dans des locaux accrédités par l'AAALAC. Ils ont été élevés dans des cages de plexiglas remplies de copeaux de bois, dans un environnement où la température était contrôlée (22 ± 2°C) avec un cycle jour/nuit de 12h, la lumière étant présente entre 7 et 19h en accord avec les normes d'Evaluation et d'Accréditation de la Protection des Animaux de Laboratoire. Chaque cage contenait un mâle et plusieurs femelles. Lorsque la femelle était reconnue gestante, elle a été isolée. La nourriture de type « LabDiet » et de l'eau ont été distribués à volonté pendant toute la durée d'élevage et d'expérience. Après la mise-bas, les rats F1 mâles et femelles de la même portée ont été assignés à différents groupes de traitements, identifiés à l'aide de chiffre et de couleurs marqués sur le dos et la queue de l'animal. Il y a toujours eu un animal assigné au groupe contrôle dans chaque portée. Environ 200 rats ont été élevés, traités et testés depuis leur naissance jusqu'à leur sacrifice durant ce projet de recherche de l'été 2014. Tous les protocoles ont été approuvés par le IACUC du l'Université d'Etat du Mississippi. Le jour de la naissance était considéré comme le jour post natal 0 (PND 0)

3. Exposition

Au PND 10, les rats d'une même portée ont été répartis dans différents groupes de traitement à l'intérieur de chaque portée (**Annexe 5. et 6**.). Il y avait toujours un animal contrôle présent de chaque portée, du même sexe, correspondant à l'animal traité au CPF. Ce projet a utilisé des rats de 27 portées. Les rats ont été traités quotidiennement de PND 10 à PND 16 à un volume de 0,5ml /kg de poids corporel par voie orale. Cette période temporelle correspond à l'âge post natal chez les humains pendant lequel le cerveau subit une maturation significative

(Andersen, 2011; Counotte, 2001). Chaque jour, le poids a été mesuré et le gain a été calculé par la différence entre le poids corporel aux jours PND11 à16 et le poids original au début du traitement au PND10. Les doses de CPF sélectionnées pour le traitement sont en dessous de la dose orale répétée NOAEL (No Observed Level Effect) pour les signes de toxicité aigüe (4.5 mg/kg) pour des rats en post-natal, mais dépassent (pour les doses intermédiaire et forte) la dose orale répétée NOAEL (aux Etats-Unis mais pas en Europe), pour l'inhibition de l'AchE dans le cerveau chez le rat de laboratoire (0,1mg/kg) et chez l'homme (0,5 mg/kg, sauf la plus faible doses qui y est égale) (Zheng, 2000). Les groupes de traitement sont : (1) contrôle (huile de maïs), (2) faible dose (0,5 mg/kg) de CPF, (3) dose intermédiaire (0,75 mg/kg) de CPF, (4) forte dose (1.0 mg/kg de CPF) et (5) 0,02 mg/kg PF-04457845 par voie orale (per os). Le PF-04457845 entraîne un niveau d'inhibition de la FAAH similaire à la plus faible concentration de CPF (environ 25%). Les doses de CPF ont été choisies pour couvrir l'intervalle entre aucune inhibition de l'AchE (0,5 mg/kg) et une faible inhibition de l'AchE (0,75 mg/kg) (Carr, 2011; 2013; 2014; 2015). Cependant, il est difficile de relier ces doses au niveau d'exposition réel chez les enfants. Le CPF et le PF-04457845 ont été dissous dans de l'huile de maïs et administrés au fond de la gorge grâce à une seringue à tuberculine de 50µl équipée d'une aiguille d'intubation droite de 25 mm et de 0,5mm de diamètre (Popper and Sons, Inc., New Hyde Park, NY). La période d'exposition correspond à la période de développement du cerveau et à la moitié de l'enfance. Après la fin de l'exposition, l'activité de la FAAH et le niveau d'AEA retournent à la normale en deux jours. Ainsi, au jour 25, tous les paramètres biochimiques sont revenus à la normale.

4. Tests comportementaux :

Les rats sont des animaux nocturnes et craintifs. C'est pour cela que chaque test comportemental est réalisé en lumière vive dans un environnement nouveau pour accentuer la réponse des rats à un environnement aversif (Bailey, 2009). De plus, il a été prouvé que l'effet de l'inhibition spécifique de la FAAH été augmenté en conditions aversives (Haller, 2009). L'émotivité des rats en réponse à leur environnement est ainsi mesurée. Les tests sont conduits à des âges différents.

4.1. Le champ ouvert de l'étude (PND 23)

L' « open field » est constitué d'une arène carrée, fermée, à murs de plexiglas opaques, de dimensions : 28 × 28 × 46 cm. Les rats ne peuvent pas voir l'expérimentateur. Une caméra en haut de la cage permet d'enregistrer les comportements de l'animal dans l'arène et la distance

totale qu'il parcourt. Le test est réalisé en lumière vive (~700 lux). Au PND23, les rats ont été transportés dans la salle de test et placés dans le coin de l' « open field »; ils ont la possibilité d'explorer la boîte pendant 20min. Après chaque test, la boîte est nettoyée grâce à de l'éthanol à 70° et séchée. Leurs mouvements est enregistré grâce au logiciel Limelight (Actimetrics, Wilmette, IL). Le logiciel divise l'arène de l'« open field » en 16 carrés de 7 x7 cm. Les quatre carrés centraux sont définis comme la zone centrale, dans laquelle l'activité de l'animal est considérée comme une manifestation de l'anxiété (Prut, 2003). Le logiciel enregistre : (**Fig.8 Exp.2 A**) le nombre total de traversées entre les carrés, (**Fig.8 Exp.2 B**) la distance totale parcourue, (**Fig.8 Exp.2C**) la traversée du carré de la zone centrale et (D) le temps passé dans la zone centrale. L'expérimentateur est naïf au traitement de l'animal.

4.2. Le labyrinthe en croix surélevé de l'étude (PND29)

Le labyrinthe en croix surélevé a la forme du signe "+". Il a été construit à partir de planches peintes en noir et est constitué de quatre bras (50 x 10 cm), deux bras ouverts et deux bras fermés par un mur de 40cm perpendiculaires. Ces bras forment une intersection perpendiculaire avec un centre carre (10x10cm). L'ensemble est surélevé à 50 cm au-dessus du sol (Annexe). Le test a été conduit sous luminosité forte (environ 600 lux dans le bras ouvert et 100 lux dans le bras fermé) pour augmenter les comportements d'anxiété et les différences entre les différents groupes de traitement (Bailey, 2009). Au PND29, les rats ont été transportés dans la salle de test et placés au centre du labyrinthe de manière à ce qu'ils puissent choisir entre les bras ouverts ou fermés. Ils ont ensuite eu 5min pour explorer le labyrinthe. Chaque session a été filmée grâce à une caméra contrôlée à distance (Canon EOS Rebel). Les vidéos ont été visionnées par deux observateurs naïfs quant au traitement et sexes des rats. Les paramètres suivants ont été rapportés :

- Nombre d'entrées dans le bras ouvert
- Temps passé dans le bras ouvert
- De ces données il a été obtenu : le pourcentage d'entrée dans le bras ouvert et le pourcentage de temps passé dans le bras ouvert
- Temps passé dans le bras fermé
- Nombre d'entrées dans le bras fermé
- Nombre total d'entrées
- Nombre de traversées de la zone centrale

- Une entrée dans un bras a été décomptée quand les quatre membres sont dans le bras. Il a été ajouté en plus les paramètres éthologiques suivants :
- Nombre de tentatives d'entrées (intention d'entrer dans le bras ouvert depuis la région carrée centrale en plaçant les deux pattes antérieures dans le bras ouvert, suivie d'une rétractation)
- Nombre de fois où le rat pointe le bout de son museau dans le bras ouvert, « museau dans le bras ouvert»
- Nombre de passages entre deux bras, fermé/fermé et ouvert/ouvert
- A la fin de chaque passage, le labyrinthe est nettoyé avec de l'éthanol à 70° et séché.

4.3. Test du comportement social de notre étude (PND 35-36)

L'aire d'expérience était une cage de plexiglas (30x20cm), remplie de copeaux de bois propres, éclairée par une lumière de 600 lux. Chaque session a été enregistré grâce à une caméra contrôlée à distance (Canon EOS Rebel). Le test comportemental est réalisé, après une période de 24h d'isolement, au PND 35 ou 36. Deux rats du même traitement, âge, sexe, taille, mais provenant de deux portées différentes, sont placés dans deux coins différents de l'aire d'expérience. Les rats y restent 10min. Deux observateurs naïfs au traitement des rats, visualisent les vidéos et enregistrent les comportements suivants (Trezza, 2010):

- Fréquence de Prise en chasse
- Fréquence de jeu mimant le combat (lutte et boxe)
- Temps passé à jouer
- Temps mis pour effectuer la première interaction
- Fréquence de toilettage
- Fréquence reniflement ou léchage de la zone ano-génitale
- Fréquence de passage au-dessus/en-dessous de l'autre rat
- Fréquence d'attaque de la nuque

Ces comportements reflètent les interactions sociales entre les rats (Vanderschuren, 1997 ; Trezza, 2010, 2012). Après chaque test, la cage est vidée, nettoyée avec de l'éthanol à 70°, séchée, puis remplie avec une nouvelle litière de copeaux.

5. Analyses statistiques

L'analyse a été conçue pour identifier les différences au niveau des facteurs fixés (sexe, traitement et portée) et toutes les interactions possibles. La distribution des résidus a été évaluée pour chaque résultat afin de déterminer la pertinence du modèle statistique. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel statistique SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Après le test d'homogénéité des variances (ANOVA) en utilisant le modèle linéaire général avec un paradigme de mesures répétées, il a été constaté que l'homogénéité des variances pour les données de gain de poids n'était pas respectée. Par conséquent, une analyse ultérieure a été effectuée avec un modèle de mesures répétées utilisant une structure de covariance de Huynh-Feldt (Huynh Feldt, 1970) par ANOVA en utilisant la procédure Mixte (Littell, 1996). Une analyse post hoc a été effectuée en utilisant la différence la moins significative. L'analyse a identifié des différences significatives dans les principaux effets (sexe, traitement et jour) et toutes les interactions possibles, l'effet portée n'était pas significatif. Pour les données comportementales, la normalité a été soumise au test de Shapiro-Wilk pour vérifier la normalité des résidus et l'homoscédasticité. Les données ne se sont pas révélées être suffisamment et normalement distribuées. En conséquence, pour déterminer les différences statistiques entre les quatre groupes de traitement, une méthode similaire au test non paramétrique de Friedman a été réalisée. Chaque sexe était considéré comme un bloc. Pour chaque résultat, les données ont été classées en premier dans chaque sexe. Une ANOVA utilisant la procédure GLM (Generalized linear model) a ensuite été effectuée sur les données classées avec traitement et sexe comme variables explicatives. S'il a été trouvé que le traitement avait un effet significatif, des différences dans les moyennes des moindres carrés avec des valeurs de p ajustées par Tukey ont été utilisées pour faire des comparaisons par paires entre les niveaux de traitement. Le critère de significativité a été fixé à $p<0,05$ pour tous les paramètres.

6. Analyses biochimiques :

Des analyses biochimiques sont venues compléter les tests comportementaux dans l'article en cours de publication.

6.1. Niveau de corticostérone dans le sérum

Nous avons euthanasié les animaux juste après la fin de la tâche comportementale « comportement social ». Après chaque euthanasie, un micro tube de sang a été prélevé sur chaque animal, et le sérum a été extrait. Ceci permettra, plus tard, de mesurer le niveau de corticostérone dans le sang sachant que l'exposition à un nouvel environnement aversif active la réponse au stress. Une augmentation du niveau de corticostérone est un indicatif de l'activation de l'axe hypothalamo-pituitaire, ce qui est le signe d'un changement dans le système du signal des EC. La cortisone sera mesurée en utilisant un kit commercial ELISA (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI).

6.2. Dissection du prosencéphale

Les cerveaux ont été disséqués pour obtenir le prosencéphale (à l'exclusion de la moelle et du cervelet). Le cerveau antérieur a été divisé en hémisphères droit et gauche et immédiatement placés dans de la glace carbonique à -80°C pour être congelé. La concentration d'EC varie considérablement dans le temps suite à la décapitation. Sugiura, en 2001, a démontré une augmentions de 5 fois du taux de 2-AG en une minute après le sacrifice. En utilisant un vibratome (**Annexe 13.)** maintenu à température négative, des tranches de cerveau de 500µm d'épaisseur ont été obtenues à partir des mâles et des femelles de chaque groupe de traitement (environ 5 réplications par traitement et par sexe). Ces tranches ont été disposées sur des lames de microscope et refroidies sur de la glace carbonique. En utilisant des aiguilles de seringue affutées, des fragments de régions d'intérêt du cerveau ont été collectées à partir de la tranche appropriée en utilisant un atlas stéréotaxique (Paxinos et Watson, 1998) comme référence.

6.3. Analyses biochimiques de régions spécifiques du cerveau

Le deuxième volet d'expérience consistait à déterminer les changements biochimiques dans le cerveau en relation avec le système des ECs, induits par le CPF ou par l'inhibiteur de la FAAH, juste après la réalisation d'une tâche comportementale. Pour s'assurer que ces changements sont directement reliés au comportement, les mêmes paramètres ont été mesurés sur des animaux, du même âge, traités au CPF, qui n'a pas effectué de test comportemental. A partir des coupes de cerveau, décrites précédemment, des analyses biochimiques ont été conduites pour mesurer la phosphorylation des récepteurs CB1. Il a été démontré que la phosphorylation des récepteurs CB1 serait un indicateur de son activation (Garcia, 1999 ; Trezza, 2012). La région d'intérêt sélectionnée était l'amygdale (**Annexe14.).** En effet, c'est

une région du cerveau fortement liée à la réactivité émotionnelle à l'environnement de l'animal. La concentration totale de CB1 est calculée pour pouvoir déterminer le ratio de CB1 phosphorylés dans cette région du cerveau par rapport aux récepteurs CB1 non phosphorylés. Ces niveaux de CB1 et de CB1 phosphorylés en fonction des différents traitements sont en cours de traitement.

D. RESULTATS DES TESTS COMPORTEMENTAUX

1. Résultats du contrôle de la toxicité et du poids des rats

Suite à l'exposition développementale répétée au CPF ou au PF-04457845, il n'y a pas eu de signe de toxicité marquée ou d'hyperstimulation cholinergique. En ce qui concerne la prise de poids, il n'y a pas eu d'effet significatif global du traitement ou du sexe mais il y a eu un effet significatif global du jour post natal ($p<0,001$) ceci indiquant ne croissance significative sur la période de traitement. Il n'y a donc pas eu d'effet significativement du traitement sur la croissance (**Fig.8 Exp.1**). L'absence d'effet de l'exposition au CPF sur le gain de poids est en accord avec les observations des études précédentes (Carr, 2011; 2014; 2015).

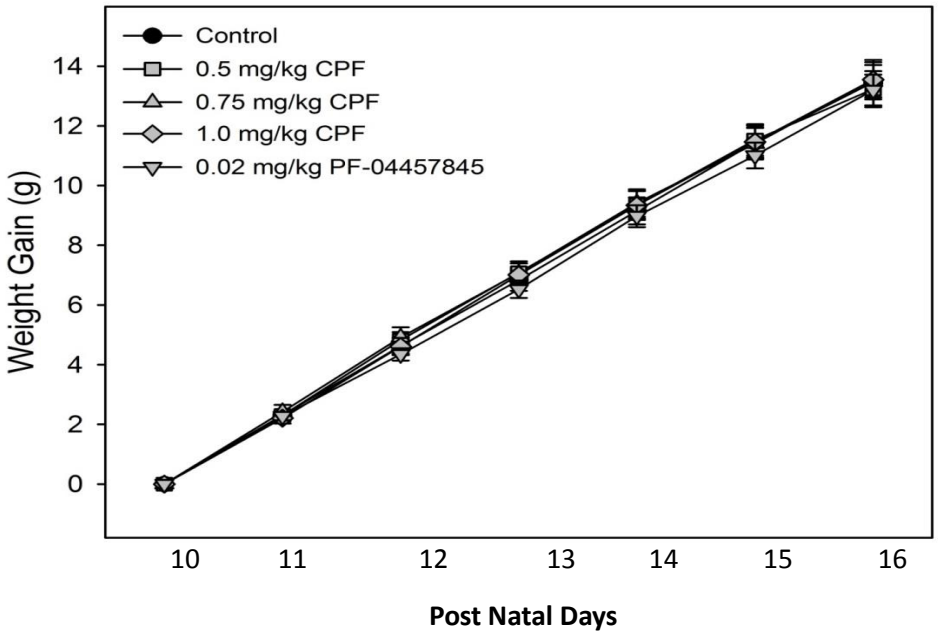


Fig.8 Exp.1: Gain de poids après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 jusqu'au jour 16 avec, soit de l'huile de maïs (control) ou 0.5, 0.75, 1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0.02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH.

1.1. L'« open field » (PND23) :

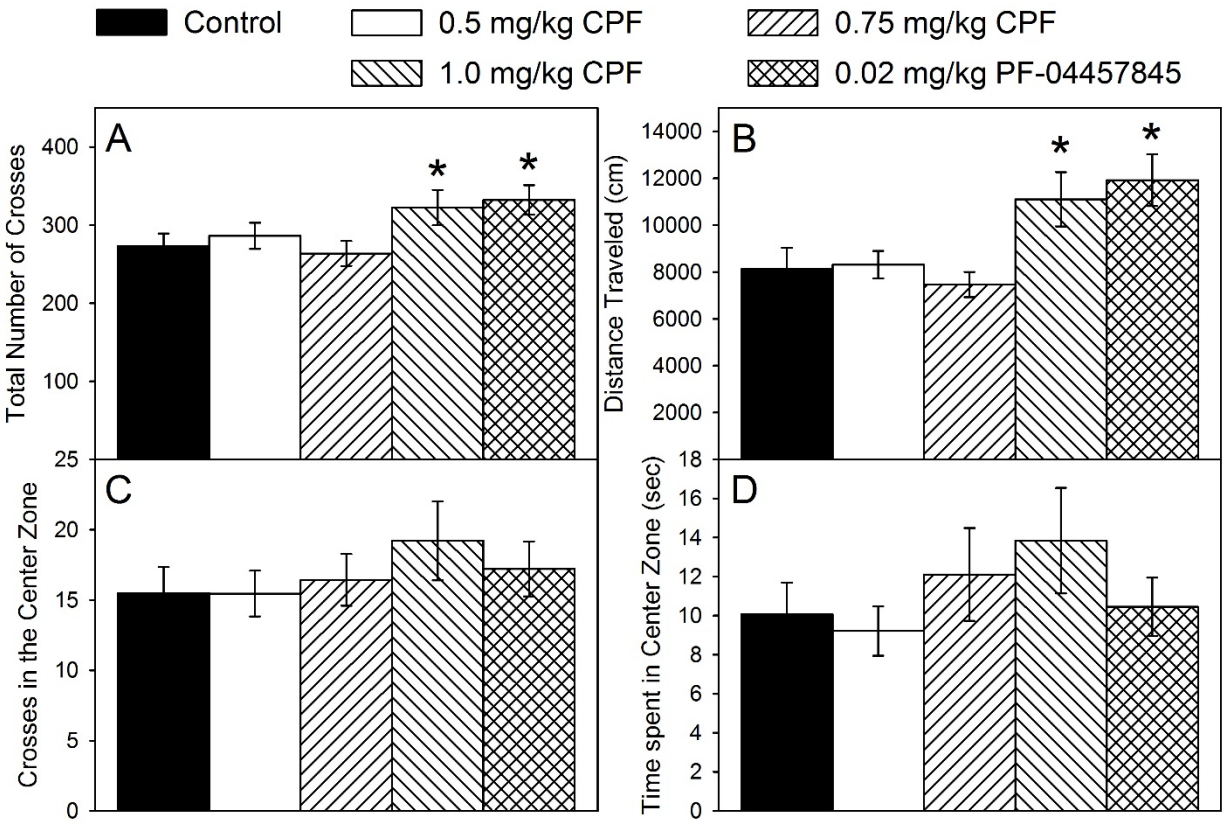


Fig.8 Exp.2 : Nombre total de traversées de lignes (A), distance parcourue (B), traversée dans la zone centrale(C), et temps passé dans la zone centrale (D) dans un « open field », testé sur des rats en jour post natal 23, après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 au jour postnatal 16 avec l'huile de maïs (control) ou 0.5, 0.75,1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0.02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SE (*n* =42-47 par dose). Les barres marquées d'un astérisque (*) sont significativement différents ($p \leq 0,05$) par rapport au contrôle

Tout d'abord, il y a eu un effet significatif global du traitement (lorsque tous les rats traités ont été regroupés ensemble indépendamment de la dose de CPF) dans l'« open field ». En effet, en ce qui concerne l'activité locomotrice dans l'«open field », l'effet significatif global se retrouve sur le nombre total de traverses de grilles de l'arène ($F_{(4,186)} = 3.78$, $p = 0,0056$) et sur la distance parcourue ($F_{(4,186)} = 5.1$, $p = 0,0006$) (**Fig.8 Exp.2 A et B**). Il n'y avait pas d'effet significatif global du sexe et pas d'interaction significative du sexe* traitement. De plus les données des mâles et femelles pour chaque paramètres ont été regroupés. Il y a eu une augmentation significative du nombre de traversée de grille (**Fig.8 Exp.2 A**) dans les traitements de groupe 1.0 mg/kg (p=0,0095) et le traitement PF-04457845 (p=0,0046) mais

pas d'effet sur les groupes de traitement 0,5 ou 0,75 mg/kg CPF. Il y a eu une augmentation significative dans la distance parcourue (**Fig.8 Exp.2 B**) dans le groupe de traitement 1.0 mg/kg CPF (p=0,0049) et le groupe de traitement PF-04457845 (p=0,0015) mais aucun effet sur les groupes 0,5 ou 0,75 mg/kg de CPF. Il n'y a pas eu d'effet significatif sur le nombre de traversées dans la zone centrale (**Fig.8 Exp.2 C**) ou sur le temps passé dans la zone centrale (**Fig.8 Exp.2 D**). On n'observe pas d'effet dose-dépendant significatif entre les différentes concentrations de CPF pour tous les paramètres mesurés. Les rats traités avec l'inhibiteur spécifique de la FAAH (PF-04457845) montrent des comportements similaires aux rats traités avec le CPF à la plus forte dose.

1.2. Labyrinthe en croix surélevé (PN29):

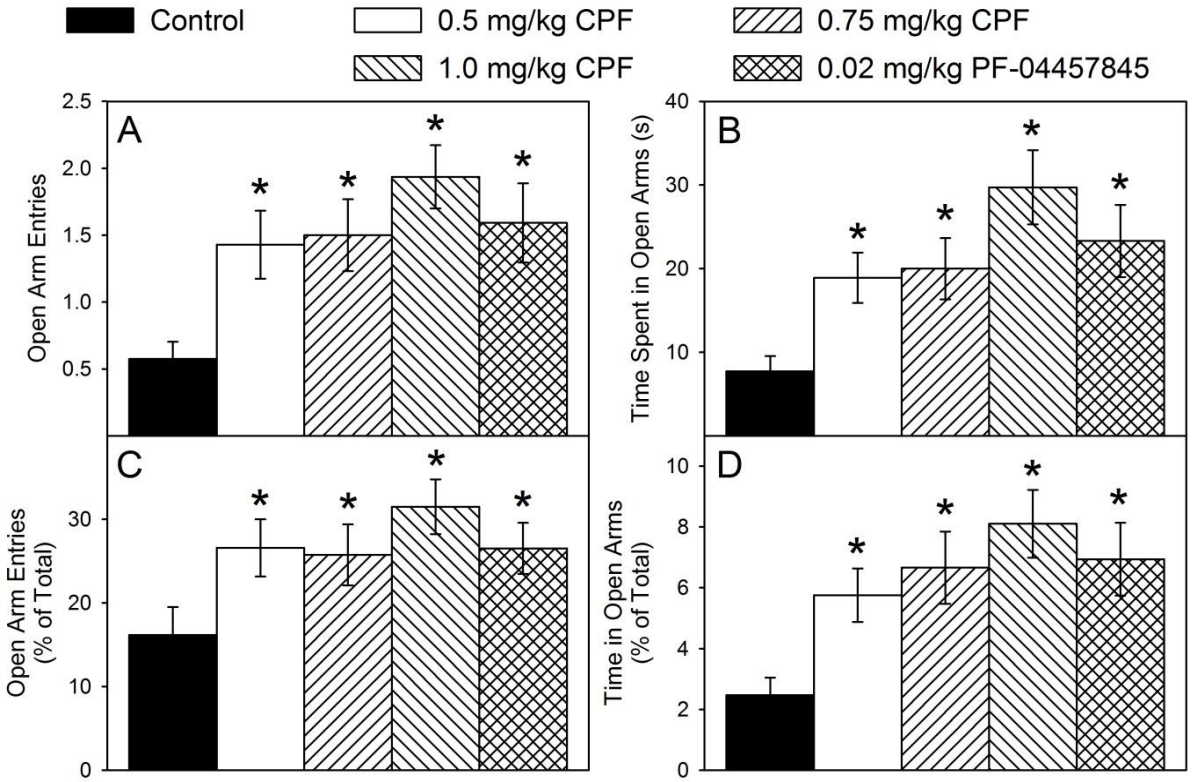


Fig.8 Exp.3 : Nombre d'entrées dans le bras ouvert (A), temps passé dans le bras ouvert) (B), nombre d'entrées dans le bras ouvert (% du nombre d'entrées total) (C) et temps passé dans le bras ouvert (% temps total) (D) dans un labyrinthe en croix surélevé au jour postnatal 29 après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 ou jour 16 avec soit de l'huile de maïs (control) ou 0.5, 0.75,1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0.02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SE (*n* =44-50 par dose). Les barres marquées d'un astérisque (*) sont significativement différents ($p \leq 0.05$) par rapport au contrôle.

En ce qui concerne les résultats dans le labyrinthe en croix surélevé, il n'y a pas eu d'effet significatif global du sexe ni d'interaction significative du sexe*traitement pour aucun des paramètres. De plus les données des mâles et des femelles ont étaient regroupées. Il n'y a pas eu d'effet global du traitement sur le nombre d'entrées dans le bras ouvert (($F_{(4,201)}$ = 5.63, p = 0,0003), sur le temps passé dans le bras ouvert ($F_{(4,201)}$ = 5.85, p = 0,0002), sur le pourcentage d'entrées dans le bras ouverts ($F_{(4,201)}$ = 2.57, p = 0,0394), et le pourcentage de temps dans le bras ouvert ($F_{(4,201)}$ = 4.94, p = 0,0008). Les rats traités avec les trois traitements de CPF et de PF-04457845 ont eu un nombre significativement plus élevé d'entrées dans le bras ouvert (**Fig.8 Exp.2 A**) et ont passé significativement plus de temps dans le bras ouvert (**Fig.8 Exp.2 B**) en comparaison du groupe contrôle. En calculant le pourcentage du total, les trois groupes de traitement du CPF et le PF-04457845 ont montré un plus fort pourcentage d'entrées dans le bras ouvert (**Fig.8 Exp.2 C**) et de pourcentage de temps passé dans le bras ouvert (**Fig.8 Exp.2 D**).

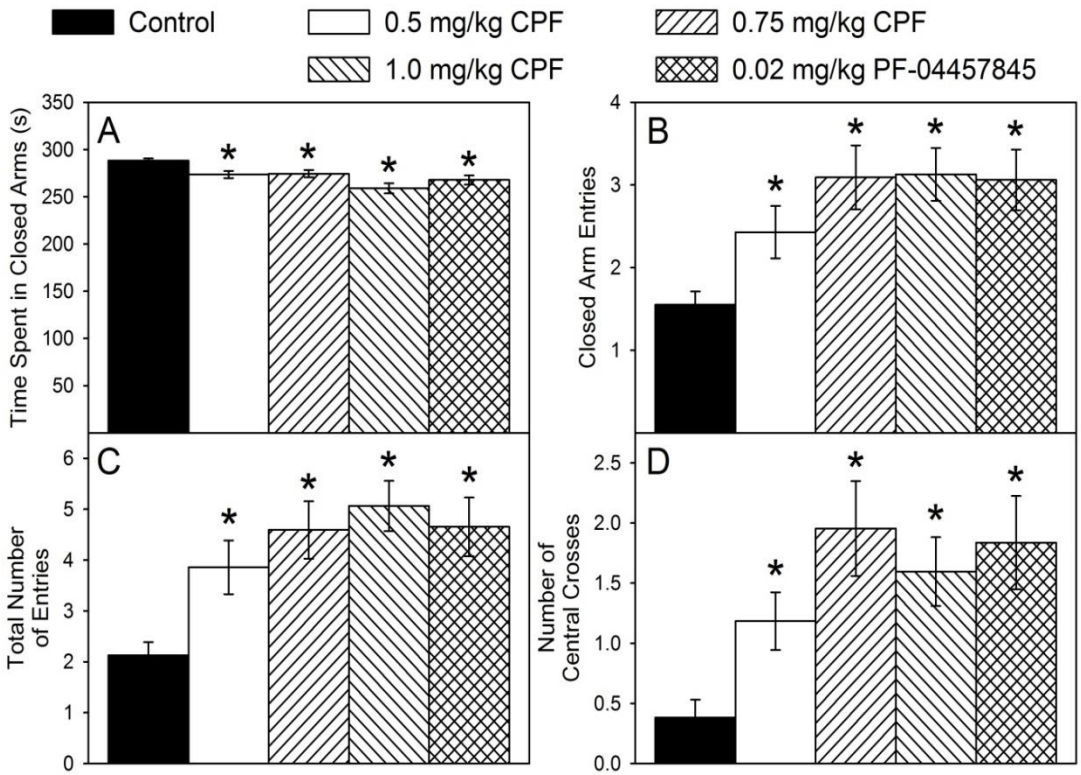


Fig. 8 Exp.4 : Temps passé dans le bras fermé (A), nombre d'entrées dans le bras fermé(B), nombre total d'entrées (C), nombre de traversées de la zone centrale (D) dans un labyrinthe en croix surélevé au jour postnatal 29 après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 ou jour 16 avec soit de l'huile de maïs (control) ou 0.5, 0.75,1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0.02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SE (*n* =44-50 par dose). Les barres marquées d'un astérisque (*) sont significativement différents (p ≤ 0.05) par rapport au

Cependant, il y a eu aussi un effet significatif global du traitement sur le temps passé dans le bras fermé $F_{(4,201)}$ = 7.68, p < 0,0001), avec les trois groupes de traitement qui ont passé moins de temps dans le bras fermé en comparaison des contrôles (**Fig. 8 Exp.4 A**), cette diminution dans le groupe de traitement est le reflet d'un temps plus élevé passé dans le bras ouvert dans ces groupes. Il y a eu un effet significatif sur le nombre d'entrées dans les bras fermés (F (4,201) = 5,93, p <0,001), le nombre d'entrées dans les bras fermés (F (4,201) = 7,68, p <0,0001) P = 0,0002), le nombre total d'entrées dans les bras (F (4,201) = 6,83, p <0,0001) et le nombre de traversées de la zone centrale (F (4,201) = 5,53, p = 0,0003). En accord avec notre hypothèse, les trois groupes de traitement CPF et le groupe de traitement PF-04457845 ont passé beaucoup moins de temps dans les bras fermés que dans le groupe contrôle (**Fig. 8 Exp.4 A**). De plus, les trois groupes de traitement CPF et le groupe de traitement PF-04457845 avaient un nombre significativement plus élevé d'entrées dans les bras fermés (**Fig. 8 Exp.4 B**), un nombre significativement plus élevé d'entrées de bras totales (**Fig. 8 Exp.4 C**) et un nombre plus élevé de traversées dans la zone centrale (**Fig. 8 Exp.4 D**) par rapport au groupe témoin. Pour le nombre plus élevé de traversées dans la zone centrale, l'augmentation est due à l'augmentation du nombre de traversées du bras fermé au bras fermé (F (4,201) = 3,96, p = 0,0041) et au nombre plus élevé de traversées du bras ouvert au bras ouvert (F (4,201) = 3,56, p = 0,0079). Bien qu'il ne soit pas détecté dans l'« open fied », le nombre plus élevé d'entrées totales de bras suggère que les rats dans les groupes traités avaient des niveaux d'activité globaux plus élevés comparativement aux contrôles. Bien que l'expression des entrées de bras ouverts et du temps aux bras ouverts en tant que pourcentage soit effectuée pour tenir compte des différences de locomotion, on a noté un effet global significatif du traitement pour le nombre d'entrées de bras fermés (F (4,201) = 5,93, p = 0,0002). Tous les groupes de traitement faisant beaucoup plus d'entrées dans les bras fermés suggérant un niveau accru d'activité dans ces groupes. Cette augmentation de l'activité est également reflétée par l'effet global significatif du traitement pour le nombre de traversées de bras fermés à bras fermés (F (4,201) = 3,96, p = 0,0041), tous les groupes de traitement effectuant des traversées aller et retour dans les bras fermés. Cependant, il y avait également un effet global significatif du traitement pour le nombre de traversées de bras ouverts à bras ouverts (F (4,201) = 3,56, p = 0,0079), tous les groupes de traitement faisant beaucoup plus de traversées d'un bras ouvert à l'autre. On n'observe pas d'effet dose-dépendant significatif entre les différentes concentrations de CPF pour tous les paramètres mesurés. Les rats traités avec l'inhibiteur spécifique de la FAAH PF-04457845 montrent des comportements similaires aux rats traités avec le CPF

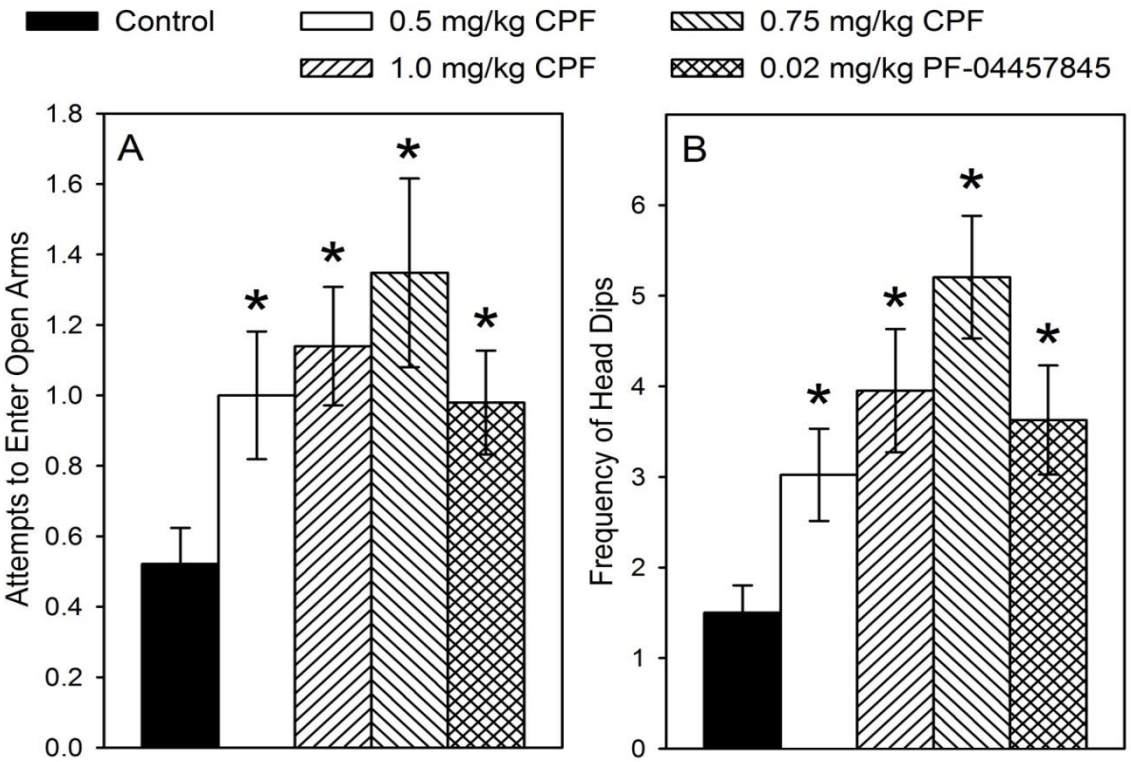


Fig. 8 Exp.5 : Tentatives d'entrées dans le bras ouvert (A), fréquence de « museau dans le bras ouvert » (B), dans un labyrinthe en croix surélevé au jour postnatal 29 après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 ou jour 16 avec soit de l'huile de maïs (control) ou 0.5, 0.75,1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0.02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SE (*n* =44-50 par dose). Les barres marquées d'un astérisque (*) sont significativement différents ($p \leq 0.05$) par rapport au contrôle.

Pour les paramètres éthologiques, il y avait un effet global significatif du traitement pour les tentatives d'entrée dans le bras ouvert (F (4,201) = 3,01, p = 0,0195) et pour le nombre de « museau dans le bras ouvert » (F (4,201) = 5,54, p = 0,0003). Tous les groupes de traitement ont fait beaucoup plus de tentatives d'entrée (**Fig.8 Exp.5 A**) et de « museau dans le bras ouvert » (**Fig.8 Exp.5 B**) que les témoins. Cependant, le traitement n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de postures d'extension du corps (F (4,201) = 1,57, p = 0,1846). Les postures d'extension du corps, les tentatives d'entrée, et le « museau dans le bras ouvert » sont des comportements éthologiques pertinents qui sont considérés comme des mesures de la prise de risque des animaux. Il n'y avait pas de différences significatives dans le nombre de postures d'extension du corps entre les groupes de traitement, mais il y avait un effet global significatif du traitement pour le nombre de tentatives d'entrées dans les bras ouverts (F

4,201) = 3,01, p <0,0195) et dans le nombre de « museau dans des bras ouverts » (F (4,201) = 5,54, p <0,0003). Les trois groupes de traitement CPF et le groupe de traitement PF-04457845 ont fait beaucoup plus de tentatives pour entrer dans les bras ouverts (**Fig.8 Exp.5** A) et significativement plus de « museau dans le bras ouvert » (**Fig.8 Exp.5 B**) que les témoins. Ces données sont compatibles avec le niveau d'activité globale plus élevé observé dans les groupes de traitement. On n'observe pas d'effet dose-dépendant significatif entre les différentes concentrations de CPF pour tous les paramètres mesurés. Les rats traités avec l'inhibiteur spécifique de la FAAH PF-04457845 montrent des comportements similaires aux rats traités avec le CPF.

2. Mesure du comportement social (PND 35):

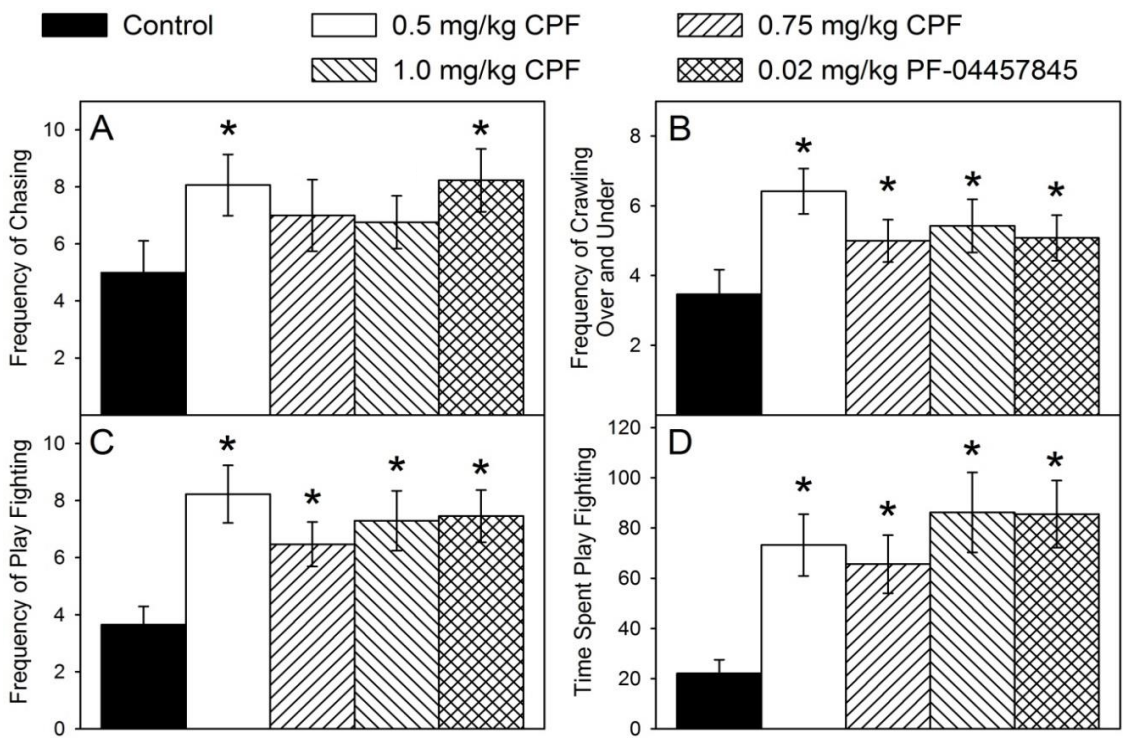


Fig. 8 Exp.6 : Fréquence de poursuites (A), fréquences de passage en dessus/dessous (B), fréquences de jeu de combat (C), temps passe à jouer(D) pendant le test d'interactions sociales au jour post natal 35 après une exposition quotidienne depuis le jour postnatal 10 ou jour 16 avec soit de l'huile de maïs (control) ou 0.5, 0.75,1.0 mg/kg de chlorpyrifos (CPF) ou 0.02 mg/kg de PF-04457845, un inhibiteur spécifique de la FAAH. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SE (*n* =20-22 par dose). Les barres marquées d'un astérisque sont significativement différents avec un seuil ($p \leq 0.05$) par rapport au contrôle.

En ce qui concerne les interactions sociales, il n'y a pas eu d'effet global significatif du sexe et aucune interaction sexe* traitement significative dans aucun paramètre. Par conséquent, les données des mâles et des femelles pour chaque paramètre ont été regroupées pour l'analyse post hoc lorsque le traitement seul était significatif. Il n'y avait aucun effet significatif sur le temps passé à faire la première interaction (**Annexe 9.**), sur la fréquence de toilettage (**Annexe 10.**), sur la fréquence du reniflement ou du léchage ano-génital (**Annexe 11.**), ou sur la fréquence des attaques de la nuque (**Annexe 12.**). Lee groupe de traitement CPF à 0,5 mg / kg avait une fréquence significativement plus élevée de poursuite ($p \leq 0,0132$) par rapport au groupe contrôle, ainsi que le groupe de traitement avec l'inhibiteur FAAH spécifique ($p \leq 0,0184$) (**Fig.8 Exp.6 A**). Cependant, il y avait un effet global significatif du traitement pour la fréquence de passage au-dessus et au-dessous, ($F (4,82) = 3,82$, $p = 0,0067$), la fréquence des combats (boxe et lutte) 82) = 6,26, $p = 0,0002$), et le temps passé à jouer ($F (4,82) = 9,28$, $p = 0,0001$). Tous les groupes de traitement présentaient une fréquence nettement plus élevée de passage au-dessus et au-dessous (**Fig.8 Exp.6B**) et de jeu de combat (**Fig.8 Exp.6C**) que les témoins. De plus, une fois que le combat de jeu a été amorcé, tous les groupes de traitement ont passé beaucoup plus de temps engagés dans des combats de jeu (**Fig.8 Exp.6D**) par rapport aux contrôles. Il n'y a pas eu de différence dose-dépendante observée entre les différentes concentrations de CPF. Les rats traités avec l'inhibiteur spécifique de la FAAH (PF-04457845) ont montré des comportements similaires aux rats traités avec le CPF.

E. DISCUSSION

1. L' « open field »:

1.1. L'open field et la mesure de l'activité locomotrice et de l'émotivité

Le test du champ ouvert ou "open field", est à l'origine un test pour mesurer l'émotion chez les rats (Cryan, 2005). Ce test permet de mesurer l'exploration d'un environnement nouveau, l'activité locomotrice générale, et procure un premier aperçu des comportements reliés à l'anxiété chez les rongeurs (Bailey, 2009). Deux facteurs influencent ces comportements d'anxiété dans l'« open field ». Le premier est isolement sociale résultant de la séparation physique des partenaires de cage quand l'animal fait le test. Le second est le stress provoqué

par une lumière vive, dans un environnement nouveau, sans abris (Prut, 2003). Ces paramètres permettent de mesurer les capacités motrices générales et le degré d'intérêt pour un environnement nouveau, certains de ces paramètres mesurent la réactivité émotionnelle ou l'anxiété. Les rongeurs, animaux nocturnes et craintifs, vont typiquement passer plus de temps à rester immobile et à explorer la périphérie de l'arène, habituellement en étant en contact avec les murs (thigmotaxis), en évitant le centre de l'arène qui est non protégé. Les rats qui passent significativement plus de temps à explorer le centre de l'arène ont des comportements caractérisés comme étant anxiolytiques (Bailey, 2009).

1.2. Discussion des résultats dans l' « open field »

Nos résultats indiquent que les rats traités avec la forte concentration de CPF et avec l'inhibiteur de la FAAH ont eu une activité locomotrice augmentée même dans un environnement aversif. Ce constat est en accord avec un rapport précédent utilisant la même dose (1 mg/kg) administrée à un âge de développement similaire (Ricceri, 2003). Comme nous l'avons indiqué précédemment (Carr, 2011; 2013; 2015), l'exposition à ce niveau de CPF entraîne une inhibition significative de l'AChE (~ 19%). Puisqu'il n'y avait pas d'inhibition de l'AChE ou de changement d'activité locomotrice observée avec les deux autres dosages de CPF, on pourrait émettre l'hypothèse que ce niveau d'activité augmenté était un effet persistant de l'inhibition de l'AChE. Cependant, l'exposition à l'inhibiteur spécifique de la FAAH (PF-04457845) a également augmenté l'activité locomotrice. Ceci contraste avec les rapports précédents selon lesquels l'exposition aiguë des adultes à l'inhibiteur de la FAAH (URB597) n'a pas modifié l'activité motrice (Hill, 2007) et l'exposition répétée prénatale / néonatale à l'URB597 n'a pas modifié l'activité motrice chez la descendance adulte (Wu, 2014). Il est également en contraste avec le rapport précédent de la diminution de l'activité locomotrice chez les animaux adultes exposés à l'URB597 pendant l'adolescence (Macri, 2012). Ainsi, il apparaît que le moment de l'exposition au cours du développement peut entraîner des effets différents en ce qui concerne l'activité locomotrice. Nos données suggèrent que l'inhibition de FAAH, à des niveaux de 60% ou plus, au cours de la période de pré-sevrage peut entraîner une augmentation de l'activité locomotrice mesurée pendant la période de préadolescence. Cependant, ce scénario d'exposition n'entraîne pas d'inhibition de la FAAH, ce qui n'engendre pas plus de temps passé dans la zone centrale du champ ouvert. Ainsi, on peut conclure à une certaine altération du niveau d'émotivité de ces rongeurs vis-à-vis de leur environnement. Cependant, le manque de différence significative entre les rats

traités et le groupe contrôle, au niveau de la traversée de la zone intérieure, suggère qu'il n'y a ici pas de diminution claire de l'anxiété.

2. Le labyrinthe en croix surélevé :

2.1.Le labyrinthe en croix surélevé et la mesure de l'émotivité et de l'anxiété

Le labyrinthe en croix surélevé (« Elevated Plus Maze » : EPM) est le test comportemental le plus utilisé en recherche pour étudier l'anxiété, il est plus précis que le test de l'«open field». Il a au départ, été conçu pour des souris et des rats ; plus récemment, pour d'autres espèces comme le cochon d'inde, les campagnols, les hamsters et les gerbilles. L'EPM a été largement utilisé comme un outil pour investiguer les bases psychologiques et neurochimiques de l'anxiété. Mais également pour tester les traitements modulant l'anxiété et certains génotypes de souris modèles de l'anxiété. Le test utilise la tendance naturelle des rongeurs à explorer un environnement nouveau. Le labyrinthe est surélevé, ainsi le bras ouvert combine les effets de la non familiarité et de l'élévation. L'EPM est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour les espaces ouverts, particulièrement lorsqu'ils sont éclairés par une forte intensité lumineuse. Ce test utilise le conflit entre l'exploration et l'aversion. Il évalue la réactivité émotionnelle, l'impulsivité, la peur ou l'anxiété en se servant de la tendance naturelle des rats à explorer un nouvel environnement versus les propriétés aversives d'un passage ouvert surélevé éclairé d'une forte luminosité (Ohl, 2003). Les profils comportementaux observés dans l'EPM incluent la néophobie, l'exploration, le conflit approche/évitement. Quand il est éclairé avec des lampes de forte intensité, il augmente les comportements d'anxiété et les différences entre les différents groupes de traitement (Bailey, 2009). Les rats sans traitement font, en temps normal, significativement moins d'entrées dans le bras ouvert par rapport au bras fermé et passent significativement moins de temps sur le bras ouvert. L'ordre de préférence est le bras fermé, le centre, le bras ouvert, indiquant un préférence pour les sections du labyrinthe sécurisantes. Le confinement dans le bras ouvert est associé à l'observation de plusieurs comportements liés à l'anxiété. Les rats confinés ont des concentrations de corticostérone dans le plasma significativement plus hautes que les rats confinés dans le bras fermé (Pellow, 1958). Une augmentation significative du pourcentage du temps passé dans le bras ouvert et du nombre d'entrées dans le bras ouvert ont été observé avec des anxiolytiques (chlordiazépoxide, diazépam…). Des composés qui provoquent de l'anxiété chez les hommes ont réduit significativement le pourcentage d'entrées, et le temps passé dans le bras ouvert (caféine, amphétamine…) (Pellow, 1958). Une forte luminosité et

un espace surélevé sont sensés réduire fortement le pourcentage d'entrées dans le bras ouvert, le pourcentage de temps passé dans le bras ouvert et l'activité totale du rat dans le labyrinthe.

2.2.Discussion des résultats du labyrinthe en croix surélevé

Nous retrouvons, dans nos résultats, un plus grand nombre d'entrées dans le bras ouvert (signe d'impulsivité) et un plus grand temps passé dans le bras ouvert (signe d'une diminution du niveau d'anxiété) par les rats traités par le CPF et ceux traités par l'inhibiteur de la FAAH. Ceci suggère que le CPF et l'inhibiteur de la FAAH diminuent le niveau de réactivité émotionnelle à un environnement aversif ; les rats sont moins anxieux. L'augmentation du nombre d'entrées dans le bras fermé témoigne également d'une diminution du niveau d'anxiété des rats. En effet, pour passer d'un bras à l'autre, les rats doivent prendre des risques et traverser le milieu du labyrinthe qui est à découvert. Ainsi les rats exposés au CPF et à l'inhibiteur de la FAAH sont passés outre l'effet inhibiteur d'une luminosité élevée, ils sont plus impulsifs et ne seraient plus capables d'inhiber leurs comportements inappropriés. Ils sont moins réceptifs à un environnement anxiogène. L'effet « dose » entre les différentes concentrations n'entre pas en jeu; peut-être que les doses choisies sont trop proches les unes des autres pour vraiment mettre en évidence une différence entre elles. Les résultats comportementaux similaires entre les rats traités au CPF et ceux traités à l'inhibiteur de la FAAH dans le labyrinthe en croix surélevé, suggère que la diminution de l'émotivité observée pourrait être le résultat de l'inhibition de la FAAH durant l'exposition développementale. Ces données suggèrent que tous les groupes de traitement ont des niveaux de comportement liés à l'anxiété réduits, ce qui peut être rapproché d'un comportement anxiolytique

2.3.Introduction des facteurs éthologiques

Les travaux précédents de l'équipe du Dr. Carr ont également suggéré un effet anxiolytique du CPF (Carr, 2015). Cependant, les rats traités ont également présenté des niveaux accrus d'activité locomotrice comme indiqué par le nombre total augmenté de traversées centraux et le nombre d'entrées de bras fermés. Ainsi, une activité locomotrice accrue pourrait être un facteur de confusion et l'activité à bras ouverts accrue pourrait être simplement le résultat d'une activité spontanée accrue. Il est difficile de déclarer simplement des niveaux d'anxiété diminués en raison de cette difficulté à dissocier l'hyperactivité du comportement anxiolytique. Les comportements éthologiques d'évaluation des risques ont été proposés

comme des mesures sensibles liées à l'anxiété sur le labyrinthe élevé (Rodgers, 1993, 1999). Parmi ces comportements, les rats traités ont présenté des épisodes augmentés de « museau dans le bras ouvert ». Dans une étude sur le labyrinthe plus élevé, l'augmentation de l'immersion de la tête dans le bras ouvert a été positivement corrélée comme un facteur de diminution de l'anxiété (Cruz, 1994). La posture d'extension du corps, un autre comportement éthologique, n'ont pas été significativement différents entre les témoins et les rats traités. Il a été montré, dans une étude, que la posture d'extension du corps n'est pas une mesure très spécifique d'anxiété (Cruz, 1994). La posture d'extension du corps peut être considérée comme une mesure de l'évaluation des risques; C'est-à-dire un comportement conçu pour recueillir des informations sur une situation potentiellement menaçante (Molewijk, 1995). Les animaux contrôles et traités ont perçu la situation de la même façon et ont peut-être éprouvé des niveaux d'anxiété semblables. Toutefois, on peut interpréter qu'une augmentation de la pulsion exploratoire chez les rats traités les rendait moins préoccupés par la situation potentiellement menaçante et plus disposée à prendre activement des risques et entrer dans les bras ouverts.

3. Le test du comportement social

3.1. Mesure de l'anxiété au travers des interactions sociales

Le test des interactions sociales est le principal test de mesure du comportement d'anxiété qui se focalise sur des concepts éthologiques pertinents. Ce test n'a pas besoin de conditions aversives ou appétitives et peut être utilisé sur des animaux naïfs. Le temps d'interaction pour chacun des rats est directement impacté par le comportement du rat partenaire. Les différents comportements observés reflètent des comportements sociaux (poursuite, reniflement…), agressifs (attaque, posture de dominance), de peur (comportement de défense, position dominée…). Les comportements considérés comme anxiolytiques sont corrélés à une augmentation de la durée des interactions sociales, l'activité motrice générale n'étant pas affectée. Au contraire, une diminution du temps passé à interagir est considérée comme une indication d'un comportement anxieux. Manipuler les conditions environnementales permet au chercheur d'introduire une variété de niveaux d'anxiété chez le sujet. Les facteurs associés à un maximum d'anxiété provoqué par l'arène sont la nouveauté et une forte illumination. Ces composants sont bien adaptés pour mesurer des effets anxiolytiques de certains composés (Files, 2003), en effet, l'illumination inhibe le comportement social (en plein jour et dans un environnement nouveau, les rats manifestent rarement des comportements de jeu). Il est

possible que cette diminution de réactivité émotionnelle puisse également altérer leur comportement social. En effet ces deux notions sont liées ; si le rat se montre trop émotif, trop sensible à son environnement, il n'exprimera pas de comportement social.

3.2. Discussion des résultats du test des interactions sociales

Malgré la présence de facteurs aversifs, les rats traités avec le CPF montrent une augmentation de leurs interactions sociales, en particulier les paramètres associés au jeu. Le l'absence différence au niveau du « temps mis pour effectuer la première interaction » suggère qu'au début, lorsque les rats sont placés dans un environnement aversif, la réponse initiale a été similaire dans tous les groupes de rats. Cependant, au fur et à mesure que le temps progresse, l'aversion pour leur environnement devient moins un facteur négatif pour les rats traités avec le CPF. Le pesticide pourrait réduire leur réactivité émotionnelle à l'environnement, ce qui expliquerait l'augmentation de la fréquence des interactions sociales. Il n'y a pas, pour les rats traités, une inhibition d'un comportement non approprié, comme le jeu, dans un environnement aversif. De même que précédemment, le fait que les animaux traités avec l'inhibiteur de la FAAH montrent des comportements similaires à ceux traités au CPF, suggère que le mécanisme d'action responsable de l'augmentation des interactions sociales, et plus particulièrement du jeu chez les rats traités au CPF, pourrait être l'inhibition de la FAAH. Celle-ci intervenant durant une exposition développementale à faible dose. L'effet dose-dépendant entre les différentes concentrations choisies n'a pas été mis en évidence dans les expériences, l'écart entre ces concentrations n'étant peut-être pas assez important.

4. Résultats similaires dans la littérature

La littérature contient de multiples rapports d'exposition au CPF entraînant des comportements sociaux altérés. Beaucoup d'entre eux impliquent soit une exposition gestationnelle, soit une exposition gestationnelle suivie d'une exposition postnatale (Venerosi, 2006). Plusieurs études ont utilisé une période d'exposition (PND11-14) semblable à celle utilisée dans cette étude mais ont évalué le comportement social chez les adultes (Venerosi, 2008); Il est donc difficile de comparer directement les résultats d'études antérieures avec les données présentées dans la présente étude. De plus, notre étude a porté sur les effets du CPF sur le jeu social et aucune de ces études précédentes n'avait évalué ce comportement. Le jeu social émerge au cours de la période de pré-sevrage tardif et sa fréquence continue

d'augmenter jusqu'à son apogée au cours de l'adolescence (PND28-40). Après quoi elle décline avec le début de la maturité sexuelle (Pellis, 1997). Ainsi, les différences d'âge dans le comportement social rendent la comparaison directe de nos résultats à d'autres études se concentrant sur des âges différents, difficile. Cependant, une étude a utilisé une période d'exposition similaire (PND 11-14) et a mesuré les interactions sociales pendant une période similaire (PND45) (Ricerri, 2003). Comme pour notre étude, Ricerri, (2003) n'ont signalé aucun effet sur les comportements non sociaux (c.-à-d., Le toilettage) ou sur les comportements d'exploration (c.-à-d., Le reniflement corporel et anogénital) mais ils ont observé des comportements accrus de sollicitation entre partenaire (Ricerri, 2003). Cependant aucun indice de jeu social n'a été mesuré. Des travaux antérieurs ont démontré que l'augmentation des taux d'anandamide, soit par l'administration de l'inhibiteur de la FAAH URB597, soit par l'inhibiteur de l'absorption des ECs, VDM11, améliore le jeu social chez les rats adolescents (Trezza et Vanderschuren, 2008a, 2008b et Manduca, 2014, Wei, 2015). Cependant, dans toutes ces études, le comportement social a été mesuré immédiatement après une administration unique de chaque composé qui aurait entraîné une accumulation de taux d'ECs pendant la période de tests comportementaux. Les données antérieures de l'équipe concernant l'exposition au chlorpyrifos juvénile (PND10-16) indiquent que l'activité de la FAAH et les taux d'ECs reviennent à des niveaux semblables à ceux des témoins quelques jours après la cessation de l'exposition (Carr, 2013). Cela suggère que les niveaux d'ECs dans le cerveau seraient à des niveaux normaux pendant le temps que nous avons conduit les tests comportementaux de cette étude. Toutefois, cela n'implique pas que l'exposition n'a pas eu d'effet durable. En fait, il y a eu plusieurs études portant sur les effets persistants de l'effet de l'inhibition de la FAAH. L'exposition répétée de l'adolescent à l'inhibiteur de la FAAH URB597 a entraîné des niveaux altérés du récepteur CB1 chez les rats adultes (Marco, 2009). Ainsi qu'une diminution de l'activité locomotrice et une diminution des taux d'inositol et de taurine dans le cortex préfrontal de la souris adulte exposée pendant l'adolescence (Macri, 2012). L'exposition gestationnelle / périnatale à URB597 n'a pas modifié la locomotion ou l'anxiété mais a augmenté les comportements de type dépressif (Wu, 2014). Bien qu'aucune de ces études ne comprenne une exposition pendant la période de développement utilisée dans la présente étude, des tendances générales dans ces études émerge. L'inhibition de FAAH pendant le développement, peut induire des changements subtils dans le comportement au cours de la vie ultérieure. Les changements dans le comportement de l'adolescent suite à l'inhibition de FAAH pendant les âges juvéniles observés dans la présente étude, en sont un exemple. L'une des études citées précédemment (Wu, 2014) a suggéré que

l'inhibition gestationnelle / périnatale de la FAAH altère la fonction des circuits de récompense chez les adultes. Le jeu social chez les adolescents est une activité très gratifiante qui implique de multiples systèmes neurochimiques, y compris les systèmes opioïdes, endocannabinoïdes, dopaminergiques et norépinephrine (Vanderschuren, 2016). Ces systèmes interagissent fréquemment, entraînant des changements dans le jeu social, mais peuvent également impliquer d'autres médiateurs moléculaires des interactions sociales, tels que la sérotonine et l'ocytocine (Hill, 2007, Wei, 2015). L'équipe de Wei, en 2015 a utilisé un inhibiteur de la FAAH ou des souris knock-out pour la FAAH et a montré une augmentation de la récompense associée aux interactions sociales chez ces souris.

F. Conclusion de l'étude expérimentale

En conclusion, nos données suggèrent qu'une exposition développementale au CPF, à faible dose, altère de manière persistante les fonctions neurologiques contrôlant la réponse de l'animal à son environnement, et régulant les interactions sociales. Ces effets seraient dus à un mécanisme indépendant de l'inhibition de l'AchE mais mettant en jeu l'inhibition de la FAAH. Dans un environnement aversif, les rats traités n'inhibent plus les comportements inappropriés ; ils sont plus impulsifs, prennent plus de risques. Ces comportements inappropriés pour un rat sont : l'exploration, sous lumière vive, d'un environnement ouvert, en hauteur et non familier, mais également le jeu avec un partenaire non familier. Le CPF aurait une activité anxiolytique sur les rats adolescents, après une exposition pendant la période correspondant à l'enfance chez les rats. Le CPF a donc une activité neurotoxique pendant le développement du cerveau, sur le long terme, chez les rats.

G. Perspectives de l'étude expérimentale :

Avoir une idée plus précise des mécanismes de neurotoxicité de ce pesticide, pourrait permettre de développer des stratégies protectrices contre ces effets néfastes, que ce soit pour développer des méthodes thérapeutiques pour traiter les individus atteints, développer des diagnostics pour identifier les symptômes des enfants affectés par les pesticides, ou préventives, en créant des insecticides plus sûrs et ainsi protéger les futures générations. Comprendre les substrats neuronaux, qui régulent les comportements émotionnels au cours de la vie, peut aider à appréhender ou traiter des maladies neuropsychiatriques comme la dépression ou l'autisme caractérisé par des niveaux altérés d'anxiété et/ ou des déficits dans

les comportements sociaux. En effet, la modulation pharmacologique des ECs semble être une stratégie prometteuse dans la gestion de maladies liées à l'anxiété (Maria & Marco, 2011). La diminution de la dégradation des ECs dans le cerveau, comme l'inhibition de la FAAH est une voie thérapeutique sélective qui peut entrainer des effets bénéfiques sur le comportement (analgésique, anxiolytique et antidépresseur). Des essais cliniques sont en cours et ont montré que l'utilisation d'agents qui inhibent la FAAH ont eu des résultats positifs dans des modèles précliniques de peur et d'anxiété (Piomelli, 2006 ; Ahn, 2009 ; Murrough, 2016). Des symptômes similaires de maladie chronique neurologique se retrouve dans le syndrome de la Maladie de la guerre du Golfe (Gulf War Illness, Lange, 2001), qui ont été observés chez 30% des vétérans de la Guerre du Golfe, or, durant cette guerre, des expositions aux OP et des agents nerveux à base de OP, ont été relatés (RAC, 2014). Or le risque actuel d'exposition à des agents neurotoxiques à base d'OP de la part d'organisations terroristes notamment, s'est confirmé lors d'attaques au gaz Sarin sur des civils en Syrie (United Nations Security Report, 2013 ; 2017).

CONCLUSION GENERALE

Le chlorpyrifos (CPF), est un pesticide de la famille des organophosphorés, suspecté d'avoir des effets neurotoxiques, au long terme, chez les enfants. Or ce pesticide est toujours utilisé, dans le monde entier, en agriculture. Ceci laisse une possibilité aux enfants d'y être exposés via leur environnement. Les autorités gouvernementales ont mis en place des valeurs toxicologiques de références pour protéger la population générale des risques que pourraient présenter ce pesticide. Mais ces valeurs toxicologiques ne prennent pas en compte le risque spécifique encouru par les enfants.

Dans une seconde partie, la neurotoxicité développementale du CPF a été approfondie. Des rats de laboratoire ont été exposés pendant la période correspondant à leur enfance à de faibles doses de CPF. Les rats traités au CPF se sont montrés moins émotifs et ont eu plus d'interactions sociales que les rats contrôles. Les rats traités avec l'inhibiteur spécifique de la FAAH ont montré les mêmes résultats que ceux traités avec le CPF. Ceci pourrait suggérer que le l'inhibition de la FAAH pourrait être le mécanisme d'action responsable d'une émotivité diminuée conduisant à plus d'interactions sociales.

Dans la prise en compte des risques sanitaire, les seuils réglementaires d'exposition au CPF ont été calculés à partir de l'inhibition de l'acétylcholinestérase or ce n'est pas la cible la plus sensible lors d'une exposition à faible dose, comme nous l'avons étudié. En effet, les doses de CPF qui ont été sélectionnées dans la partie expérimentale, sont en dessous ou égales à la NOAEL, établie par l'Union Européenne (AGRITOX, 2015), pour une toxicité répétée chez le rat (1mg /kg p.c.j per os). Dans notre étude, les rats traités avec la dose en dessous de ce seuil (0,5mg/kg), dose à laquelle il n'y a pas d'inhibition de l'acétylcholinestérase détectable, ont montré des altérations comportementales. Cette NOAEL répétée établie par l'Union Européenne serait donc à revoir et devrait prendre en compte la toxicité du CPF sur le système des endocannabinoïdes. De plus, nous avons vu que les enfants, par rapport aux adultes, étaient plus fortement exposés à ce pesticide et particulièrement sensibles à ses effets neurotoxiques, donc le risque entrainé par une exposition au CPF est encore accru. Par ailleurs, les altérations comportementales observées chez les rats de notre étude pourraient être rapprochées des perturbations psychologiques observées chez les enfants des communautés agricoles, notamment l'ADHD (déficit d'attention et hyper activité). Cette nouvelle neurotoxicité n'est jamais prise en compte dans les mesures de protection ; donc toutes les normes seraient à revoir pour prendre en compte tous les risques auxquels les enfants sont exposés.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE TOULOUSE

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Martine CLAUW, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LOYANT Louise** intitulée **« Neurotoxicité développementale du chlorpyrifos sur le système endocannabinoïde : Effets comportementaux chez le rat.»** et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 2 juin 2017
Professeur Martine CLAUW
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Jean PARINAUD

Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU

Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Université de Toulouse

Bibliographie

Dans l'ordre alphabétique:

- Abdel-Rahman, A. A. *et al.* Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of [(14)C]chlorpyrifos in pregnant rats. *Arch. Toxicol.* **76,** 452–459 (2002).
- AGRITOX (2015)- chlorpyriphos-ethyl - fiche d'information substance active phytopharmaceutique, http://www.agritox.anses.fr/php/sa.php?sa=251
- Ahn, K., Johnson, D. S. & Cravatt, B. F. Fatty acid amide hydrolase as a potential therapeutic target for the treatment of pain and CNS disorders. *Expert Opin Drug Discov* **4,** 763–784 (2009)..
- Akhtar, N., Srivastava, M. K. & Raizada, R. B. Transplacental disposition and teratogenic effects of chlorpyrifos in rats. *J Toxicol Sci* **31,** 521–527 (2006).
- Aldridge, J. E., Levin, E. D., Seidler, F. J., & 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. Environmental Health Perspectives, 113(5), 527–531.
- Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005b). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. Environmental Health Perspectives, 113(8), 1027–1031.
- Aldridge, J. E., Seidler, F. J., Meyer, A., Thillai, I., & Slotkin, T. A. (2003). Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods. Environmental Health Perspectives, 111(14), 1736–1743.
- Ames, R. G. *et al.* Health symptoms and occupational exposure to flea control products among California pet handlers. *Am Ind Hyg Assoc J* **50,** 466–472 (1989).
- Anses, AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation m de l'environnement et du travail relatif à l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire liés aux résidus de pesticides, Saisine numéro 2013-SA-01123, 2 avril 2014. https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-l%E2%80%99anses-relatif-%C3%A0-l%E2%80%99actualisation-des-indicateurs-de-risque-alimentaire-li%C3%A9-aux

- Aprea, C., Strambi, M., Novelli, M. T., Lunghini, L. & Bozzi, N. Biologic monitoring of exposure to organophosphorus pesticides in 195 Italian children. *Environ Health Perspect* **108,** 521–525 (2000).
- Arcury, T. A. *et al.* Pesticide urinary metabolite levels of children in eastern North Carolina farmworker households. *Environ. Health Perspect.* **115,** 1254–1260 (2007).
- Bailey, K. R. & Crawley, J. N. in Methods of Behavior Analysis in Neuroscience (ed. Buccafusco, J. J.) (CRC Press/Taylor & Francis, 2009).
- Bakke, J. E., Feil, V. J. & Price, C. E. Rat urinary metabolites from O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate. *J Environ Sci Health B* **11,** 225–230 (1976).
- Barr, D. B. & Angerer, J. Potential uses of biomonitoring data: a case study using the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and malathion. *Environ. Health Perspect.* **114,** 1763–1769 (2006).
- Berkowitz, G. S. *et al.* In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ. Health Perspect.* **112,** 388–391 (2004).
- Bielawski, D., Ostrea, E., Posecion, N., Corrion, M. & Seagraves, J. Detection of Several Classes of Pesticides and Metabolites in Meconium by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia* **62,** 623–629 (2005).
- Bortolato, M. et al. Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. Biol. Psychiatry 62, 1103–1110 (2007).
- Bouchard, M. F. *et al.* Prenatal Exposure to Organophosphate Pesticides and IQ in 7-Year-Old Children. *Environ Health Perspect***119,** 1189–1195 (2011).
- Brenhouse, H. C. & Andersen, S. L. Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev* **35,** 1687–1703 (2011).
- Brenner, F. E., Bond, G. G., McLaren, E. A., Green, S. & Cook, R. R. Morbidity among employees engaged in the manufacture or formulation of chlorpyrifos. *Br J Ind Med***46,** 133–137 (1989).
- Byrne, S. L., Shurdut, B. A. & Saunders, D. G. Potential chlorpyrifos exposure to residents following standard crack and crevice treatment. *Environ. Health Perspect.***106,** 725–731 (1998).

- Carr, R. L. & Nail, C. A. Effect of Different Administration Paradigms on Cholinesterase Inhibition following Repeated Chlorpyrifos Exposure in Late Preweanling Rats. *Toxicol Sci* **106,** 186–192 (2008).
- Carr, R. L. *et al.* Decreased Anxiety in Juvenile Rats Following Exposure to Low Levels of Chlorpyrifos During Development. *NeuroToxicology* doi:10.1016/j.neuro.2015.11.016
- Carr, R. L., Borazjani, A., and Ross, M. K. 2011. Effect of developmental chlorpyrifos exposure on endocannabinoid metabolizing enzymes in the brain of juvenile rats. *Toxicol. Sci.* **122**, 112-120.
- Carr, R.L. and Chambers, J.E. 1991. Acute effects of the organophosphate paraoxon on schedule-controlled behavior and esterase activity in rats: dose-response relationships. *Pharmacol. Biochem. Behav*. **40**, 929-936.
- Carr, R.L. C.A. Graves, L.C. Mangum, C.A. Nail and M.K. Ross. 2014. Low level chlorpyrifos exposure increases anandamide accumulation in juvenile rat brain in the absence of brain cholinesterase inhibition. Neurotoxicology. Doi: 10.1016/j.neuro.2013.12.009. Epub ahead of print. In press. PMID: 24373905
- Carr, R.L., Adams, A.L., Kepler, D.R., Ward, A.B., Ross, M.K. 2013. Induction of endocannabinoid levels in juvenile rat brain following developmental chlorpyrifos exposure. *Toxicol Sci.* **135**, 193-201.
- Casey, B. J., Giedd, J. N. & Thomas, K. M. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biological Psychology* **54,** 241–257 (2000).
- Chai, L.-K., Mohd-Tahir, N. & Bruun Hansen, H. C. Dissipation of acephate, chlorpyrifos, cypermethrin and their metabolites in a humid-tropical vegetable production system. *Pest Manag. Sci.* **65,** 189–196 (2009).
- Chambers. H.W. Organophosphorus compounds; An overview, Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects J. Chambers, and P. Levi. Academic Press, New York, (1992)11–12.
- Chen, W.-Q. *et al.* Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. *Neurotoxicology* **32,** 355–361 (2011).

- Chen, W.-Q., Zhang, Y.-Z., Yuan, L., Li, Y.-F. & Li, J. Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. *Neurosci. Lett.* **570,** 76–80 (2014).
- CNESST : Commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail, Quel est le cheminement d'un toxique dans l'organisme ? http://www.csst.qc.ca/prevention/reptox/toxicologie/notions-toxicologie/Pages/04-quel-est-cheminement-toxique-dans-organisme.aspx
- Cochran, R. C. Appraisal of risks from nonoccupational exposure to chlorpyrifos. Regul. Toxicol. Pharmacol. 35, 105–121 (2002).
- Colborn, T. A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. Environ. Health Perspect. 114, 10–17 (2006).
- Cole, J. C. & Rodgers, R. J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. Behav Pharmacol 4, 573–580 (1993).
- Cole, T. B. *et al.* Toxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon in a transgenic mouse model of the human paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism. *Pharmacogenet. Genomics* **15,** 589–598 (2005).
- Corley, R. A., Calhoun, L. L., Dittenber, D. A., Lomax, L. G. & Landry, T. D. Chlorpyrifos: a 13-week nose-only vapor inhalation study in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* **13,** 616–618 (1989).
- Counotte, D. S., Smit, A. B., Pattij, T. & Spijker, S. Development of the motivational system during adolescence, and its sensitivity to disruption by nicotine. *Dev Cogn Neurosci* **1,** 430–443 (2011).
- Cravatt, B. F. *et al.* Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98,** 9371–9376 (2001).
- Cruz, A. P., Frei, F. & Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49,** 171–176 (1994).
- Cryan, J. F. & Holmes, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* **4,** 775–790 (2005).
- Cryan, J. F. & Sweeney, F. F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **164,** 1129–1161 (2011).

- Dalvie, M. A., Sosan, M. B., Africa, A., Cairncross, E. & London, L. Environmental monitoring of pesticide residues from farms at a neighbouring primary and pre-school in the Western Cape in South Africa. *Sci. Total Environ.* **466-467,** 1078–1084 (2014).
- Dam, K., Garcia, S. J., Seidler, F. J. & Slotkin, T. A. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. *Developmental Brain Research* **116,** 9–20 (1999).
- Dunphy J, Kesselbrenner M, Stevens A, Vlec B: Pesticide poisoning in an infant. California Morbidity and Mortality
- Eaton, D. L. *et al.* Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology* **38,** 1–125 (2008).
- EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide human health risk assessment of the active substance chlorpyrifos. EFSA Journal 2014; 12(4): 3640, 34pp. doi :10.2903/d.efsa.2014.3640, www.efsa.europa.eu/efsajournal
- Emerick, G. L., DeOliveira, G. H., dos Santos, A. C., & Ehrich, M. (2012). Mechanisms for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. *Chemico-Biological Interactions*, *199*(3), 177–184. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.07.002
- Engel, S. M. *et al.* Prenatal Exposure to Organophosphates, Paraoxonase 1, and Cognitive Development in Childhood. *Environ Health Perspect* **119,** 1182–1188 (2011).
- Fenske, R. A. *et al.* Potential exposure and health risks of infants following indoor residential pesticide applications. *Am J Public Health* **80,** 689–693 (1990).
- Fernandez-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernandez, M. L., Ramos, J. A. 2000. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci.* **23**, 14-20.
- File, S. E. & Seth, P. A review of 25 years of the social interaction test. Eur. J. Pharmacol. 463, 35–53 (2003).
- Fujioka, K. & Casida, J. E. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **20,** 1211–1217 (2007).

- Furlong CE, Holland N, Richter RJ, Bradman A, Ho A, Eskenazi B,PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. Pharmacogenet Genomics. 2006 Mar;16(3):183-90.
- Garcia-Gil, L., De Miguel, R., Romero, J., Perez, A., Ramos, J. A., Fernandez-Ruiz, J. J. 1999. Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA, but not GABA, receptor agonists in adult rats, *Neurotoxicol. Teratol*. **21**, 277-283.
- Geer, L. A. *et al.* Comparative analysis of passive dosimetry and biomonitoring for assessing chlorpyrifos exposure in pesticide workers. *Ann Occup Hyg***48,** 683–695 (2004).
- Gerde, P. & Scott, B. R. A model for absorption of low-volatile toxicants by the airway mucosa. Inhal Toxicol 13, 903–929 (2001).
- Gibson, J. E., Peterson, R. K. & Shurdut, B. A. Human exposure and risk from indoor use of chlorpyrifos. *Environ Health Perspect* **106,** 303–306 (1998).
- Grabovska, S. & Salyha, Y. ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. Arh Hig Rada Toksikol 66, 121–127 (2015).
- Grandjean, P., Harari, R., Barr, D. B., & Debes, F. (2006). Pesticide exposure and stunting as independent predictors of neurobehavioral deficits in Ecuadorian school children. *Pediatrics*, *117*(3), e546–556. https://doi.org/10.1542/peds.2005-1781
- Griffin, P., Mason, H., Heywood, K. & Cocker, J. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study. *Occup Environ Med* **56,** 10–13 (1999).
- Haller, J. *et al.* Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. *Eur J Neurosci* **25,** 2445–2456 (2007).
- Haller, J. *et al.* Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* **204,** 607–616 (2009).
- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C. & Freund, T. F. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur. J. Neurosci.* **16,** 1395–1398 (2002).

– Harkany, T., Keimpema, E., Barabás, K. & Mulder, J. Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286,** S84–90 (2008).
– Hernandez, C. M. *et al.* Repeated exposure to chlorpyrifos leads to prolonged impairments of axonal transport in the living rodent brain. *Neurotoxicology* **47,** 17–26 (2015)..
– Hill, M. N., Karacabeyli, E. S. & Gorzalka, B. B. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology***32,** 350–357 (2007).
– Hunter, D. L., Lassiter, T. L. & Padilla, S. Gestational exposure to chlorpyrifos: comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158,** 16–23 (1999).
– INERIS- Données technico-économiques sur les substances chimiques en France, Chlorpyrifos (Chlorpyrifos-Ethyl), Respnsable de Programme : J.M. Brignon, Expert ayant participé a la rédaction : A.Gouzy, 2006. http://www.ineris.fr/substances/fr/
– INSERM. Pesticides, effets sur la sante [« Pesticide Health Effets »]. Collective Expertise collection, INSERM, Paris, 2013. http://www.inserm.fr/actualites/rubriques/actualites-societe/pesticides-effets-sur-la-sante-une-expertise-collective-de-l-inserm
– Jacob, W. *et al.* Endocannabinoids render exploratory behaviour largely independent of the test aversiveness: role of glutamatergic transmission. *Genes Brain Behav.* **8,** 685–698 (2009)..
– Jiang, W. *et al.* Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J. Clin. Invest.***115,** 3104–3116 (2005).
– Jokanović, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology***166,** 139–160 (2001).
- Jokanovic, M., Stukalov, P. V., & Kosanovic, M. (2002). Organophosphate induced delayed polyneuropathy. *Current Drug Targets. CNS and Neurological Disorders*, *1*(6), 593–602
– Kathuria, Satish, Gaetani, Silvana, Fegley, Darren, Valiño, Fernando, Duranti, Andrea. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nature Medicine.

Jan2003, Vol. 9 Issue 1, p76. 6p

- Koch, D., Lu, C., Fisker-Andersen, J., Jolley, L., Fenske, R.A. 2002. Temporal association of children's pesticide exposure and agricultural spraying: report of a longitudinal biological monitoring study. *Environ. Health Perspect.* **110**, 829-833.
- Kousba AA, Poet TS, Timchalk C, 2007 Age-Related Brain Cholinesterase Inhibition Kinetics following In Vitro Incubation with Chlorpyrifos-Oxon and Diazinon-Oxon (PDF Download Available). ResearchGate doi:http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfl123
- Lange G, A. Van Niekerk, B.J. Meyer. Detection of an artifact on lumbar SPECT. [Case Reports] Clinical Nuclear Medicine, 26 (5) (2001), pp. 446–448
- Latuszynska, J., Luty, S., Raszewski, G., Przebirowska, D. & Tokarska-Rodak, M. Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. *Ann Agric Environ Med***10,** 197–201 (2003).
- Levin, E. D. *et al.* Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicol Teratol* **24,** 733–741 (2002).
- Li, A. A., Lowe, K. A., McIntosh, L. J. & Mink, P. J. Evaluation of epidemiology and animal data for risk assessment: chlorpyrifos developmental neurobehavioral outcomes. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev***15,** 109–184 (2012).
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., and Wolfinger, R. D. (1996). SAS System for Mixed Models. SAS Institute, Cary, NC.
- Liu, J. & Pope, C. The cannabinoid receptor antagonist AM251 increases paraoxon and chlorpyrifos oxon toxicity in rats. *Neurotoxicology***46,** 12–18 (2015).
- Liu, J., Parsons, L. & Pope, C. Comparative effects of parathion and chlorpyrifos on endocannabinoid and endocannabinoid-like lipid metabolites in rat striatum. *Neurotoxicology***50,** 20–27 (2015).
- Long, J. Z. & Cravatt, B. F. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem. Rev.* **111,** 6022–6063 (2011).
- Lovasi, G. S. *et al.* Chlorpyrifos Exposure and Urban Residential Environment Characteristics as Determinants of Early Childhood Neurodevelopment. *Am J Public Health* **101,** 63–70 (2011).
- Lutz, B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. *Current Opinion in Pharmacology* **9,** 46–52 (2009).

- Macrì, S., Ceci, C., Canese, R. & Laviola, G. Prenatal stress and peripubertal stimulation of the endocannabinoid system differentially regulate emotional responses and brain metabolism in mice. *PLoS ONE* **7,** e41821 (2012).
- Manduca, A. *et al.* Distinct roles of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol in social behavior and emotionality at different developmental ages in rats. *European Neuropsychopharmacology***25,** 1362–1374 (2015).
- Marco EM, García-Gutie´rrez MS, Bermu´ dez-Silva FJ, Moreira FA, Guimaraes F, Manzanares J, Viveros MP (2011) Endocannabinoid system and psychiatry: in search of neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. Front Behav Neurosci 5:63.
- Marco, E. M. *et al.* Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: Modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **86,** 334–345 (2007).
- Marco, E. M., Rubino, T., Adriani, W., Viveros, M-P, Parolaro, D., Laviola, G. 2009. Long-term consequences of URB597 administration during adolescence on cannabinoid CB1 receptor binding in brain areas. Brain Res. 1257, 25-31.
- Martin, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R. & Valverde, O. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. *Psychopharmacology (Berl.)* **159,** 379–387 (2002).
- Mato, S. et al. A single in-vivo exposure to delta 9THC blocks endocannabinoid-mediated synaptic plasticity. Nat. Neurosci. 7, 585–586 (2004).
- Mattsson, J. L., Maurissen, J. P., Nolan, R. J. & Brzak, K. A. Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* **53,** 438–446 (2000)..
- Maurissen, J. P., Hoberman, A. M., Garman, R. H. & Hanley, T. R. Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos. *Toxicol. Sci.* **57,** 250–263 (2000).
- Meuling, W. J. A., Ravensberg, L. C., Roza, L. & van Hemmen, J. J. Dermal absorption of chlorpyrifos in human volunteers. *Int Arch Occup Environ Health* **78,** 44–50 (2005).
- Meyer, A., Seidler, F. J., Aldridge, J. E. & Slotkin, T. A. Developmental exposure to terbutaline alters cell signaling in mature rat brain regions and augments the effects of

subsequent neonatal exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***203,** 154–166 (2005).

- Molewijk, H. E., van der Poel, A. M. & Olivier, B. The ambivalent behaviour 'stretched approach posture' in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. *Psychopharmacology (Berl.)* **121,** 81–90 (1995).
- Moreira, F. A. & Wotjak, C. T. Cannabinoids and anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* **2,** 429–450 (2010).
- Moreira, F. A., Kaiser, N., Monory, K. & Lutz, B. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* **54,** 141–150 (2008).
- Morgan, M. K. & Jones, P. A. Dietary predictors of young children's exposure to current-use pesticides using urinary biomonitoring. *Food Chem. Toxicol.* **62,** 131–141 (2013).
- Moser, V. C., Chanda, S. M., Mortensen, S. R. & Padilla, S. Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. Toxicol. Sci. 46, 211–222 (1998).
- Kofman O, Berger A, Massarwa A, Friedman A, Jaffar AA. Motor Inhibition and Learning Impairments in School-Aged Children Following Exposure to Organophosphate Pesticides in Infancy. Pediatr Res. 2006 Jul;60(1):88-92.
- Muller, M. *et al.* Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. *Neurotoxicology* **45,** 22–30 (2014)..
- Murrough, J. W., Yaqubi, S., Sayed, S. & Charney, D. S. Emerging Drugs for the Treatment of Anxiety. *Expert Opin Emerg Drugs***20,** 393–406 (2015).
- Naidu, P. S. *et al.* Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl.)* **192,** 61–70 (2007).
- Needham, L. L. Assessing Exposure to Organophosphorus Pesticides by Biomonitoring in Epidemiologic Studies of Birth Outcomes. Environ Health Perspect 113, 494–498 (2005).
- NHANES, United States Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Health Statistics. (2009). National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2000: Version 4. Retrieved from http://www.icpsr.umich.edu/NACDA/studies/25501/version/4

– Nolan, R. J., Rick, D. L., Freshour, N. L. & Saunders, J. H. Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **73,** 8–15 (1984).
– Nomura, D. K. & Casida, J. E. Activity-based protein profiling of organophosphorus and thiocarbamate pesticides reveals multiple serine hydrolase targets in mouse brain. J. Agric. Food Chem. 59, 2808–2815 (2011).
– Nomura, D. K. et al. Activation of the endocannabinoid system by organophosphorus nerve agents. Nat. Chem. Biol. 4, 373–378 (2008).
– O'Shea, M., McGregor, I. S. & Mallet, P. E. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* **20,** 611–621 (2006).
– Ohl, F. (2003). Testing for anxiety. Clinical Neuroscience Research, 3, 233-238.
- OMS, Bibliothèque de l'OMS Statistiques sanitaires mondiales 2014. ISBN 978 92 4 069268 8
- ONU, Conseil de sécurité, Le Conseil de sécurité condamne l'emploi d'armes chimiques en Syrie, qu'il qualifie de « menace contre la paix et la sécurité internationales », 27 septembre 2013 : https://www.un.org/press/fr/2013/CS11135.doc.htm. Déclaration à la presse faite par le Conseil de sécurité sur la Syrie 10 mars 2017 : https://www.un.org/press/fr/2017/sc12749.doc.htm).
– Ostrea, E. M. *et al.* Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ. Res.* **109,** 116–122 (2009).
– Patel, S. & Hillard, C. J. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318,** 304–311 (2006).
– Patton, G. C. *et al.* Cannabis use and mental health in young people: cohort study. *BMJ* **325,** 1195–1198 (2002).
– Paxinos and Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 1998: Hard Cover Edition

- Pellis, S. M. & Pellis, V. C. The prejuvenile onset of play fighting in laboratory rats (Rattus norvegicus). *Dev Psychobiol* **31,** 193–205 (1997).
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* **14,** 149–167 (1985).
- Peterson, B. S. *et al.* Effects of Prenatal Exposure to Air Pollutants (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on Development of Brain White Matter, Cognition, and Behavior in Later Childhood. *JAMA Psychiatry* **72,** 531–540 (2015).
- Piomelli, D. *et al.* Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev***12,** 21–38 (2006).
- Poet, T. S., Timchalk, C., Hotchkiss, J. A. & Bartels, M. J. Chlorpyrifos PBPK/PD model for multiple routes of exposure. *Xenobiotica***44,** 868–881 (2014).
- Prut, L. & Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* **463,** 3–33 (2003).
- Quistad, G. B., Klintenberg, R., Caboni, P., Liang, S. N., Casida, J. E. 2006. Monoacylglycerol lipase inhibition by organophosphorus compounds leads to elevation of brain 2-arachidonoylglycerol and the associated hypomotility in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***211**, 78-83.
- Quistad, G. B., Sparks, S. E., Casida, J. E. 2001. Fatty acid amide hydrolase inhibition by neurotoxic organophosphorus pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol.* **173**, 48-55.
- Quistad, G. B., Sparks, S. E., Segall, Y., Nomura, D. K. & Casida, J. E. Selective Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Relative to Neuropathy Target Esterase and Acetylcholinesterase: Toxicological Implications. *Toxicology and Applied Pharmacology* **179,** 57–63 (2002).
- Quistad, G. B., Sparks, S. E., Segall, Y., Nomura, D. K., Casida, J. E. 2002. Selective inhibitors of fatty acid amide hydrolase relative to neuropathy target esterase and acetylcholinesterase: toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **179**, 57-63.
- RAC: 2014, Research Advisory Committee on Gulf War Veterans' Illnesses, https://www.va.gov/rac-gwvi/
- Ramos, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol. Sci. 29, 493–498 (2008).

- Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D. & Izídio, G. S. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav. Brain Res.***193,** 277–288 (2008)..
- Rauh, V. A. *et al.* Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109,** 7871–7876 (2012).
- Rauh, V. A., Garfinkel, R., Perera, F. P., Andrews, H. F., Hoepner, L., Barr, D. B., Whitehead, R., Tang, D., 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-e1859.
- Rauh, V. A., Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X., Liu, J., Barr, D. B., Slotkin, T. A., Peterson, B. S. 2012. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 7871-7876.
- Rauh, V. *et al.* Seven-Year Neurodevelopmental Scores and Prenatal Exposure to Chlorpyrifos, a Common Agricultural Pesticide. *Environ Health Perspect* **119,** 1196–1201 (2011).
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D. B., Whyatt, R. 2011. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ. Health Perspect.* **119**, 1196-1201.
- Ricceri, L. *et al.* Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **191,** 189–201 (2003).
- Roegge, C. S., Timofeeva, O. A., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. & Levin, E. D. Developmental diazinon neurotoxicity in rats: later effects on emotional response. *Brain Res. Bull.***75,** 166–172 (2008).
- Rohlman, D. S., Anger, W. K. & Lein, P. J. Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorous pesticide exposure. *Neurotoxicology* **32,** 268–276 (2011).
- Roy, T. S., Seidler, F. J. & Slotkin, T. A. Morphologic effects of subtoxic neonatal chlorpyrifos exposure in developing rat brain: regionally selective alterations in neurons and glia. *Brain Res. Dev. Brain Res.***148,** 197–206 (2004).

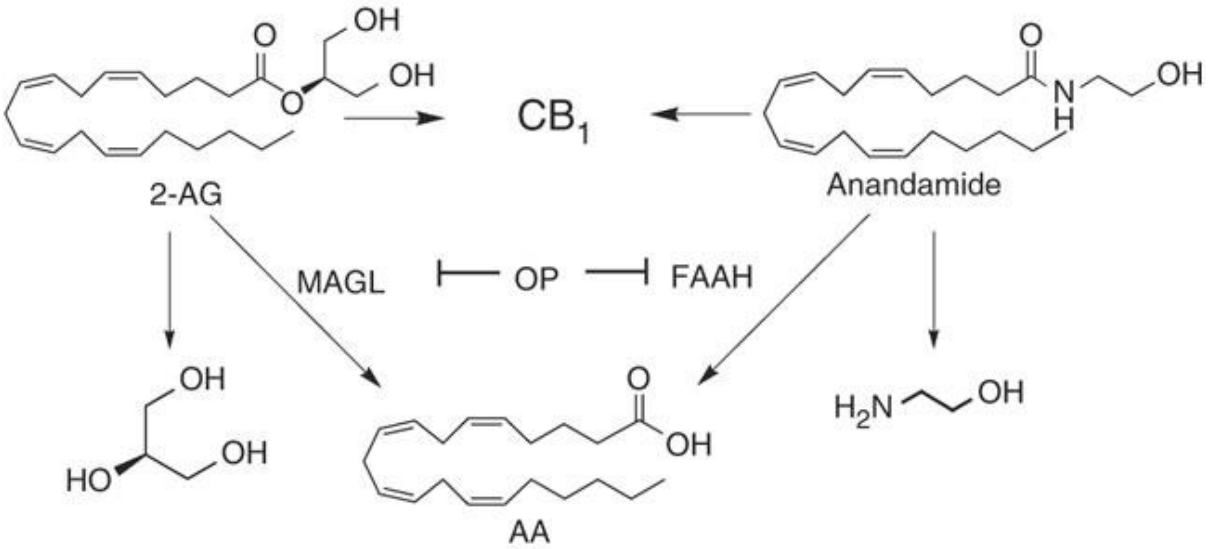
- Sanghi, R., Pillai, M. K. K., Jayalekshmi, T. R. & Nair, A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol* **22,** 73–76 (2003).
- Saunders, M. *et al.* Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a literature review and expert elicitation on research and policy. *Environ Health* **11 Suppl 1,** S5 (2012).
- Savy, C. Y. *et al.* Low-level repeated exposure to diazinon and chlorpyrifos decrease anxiety-like behaviour in adult male rats as assessed by marble burying behaviour. *Neurotoxicology* **50,** 149–156 (2015).
- Scherer, K. R. Emotions are emergent processes: they require a dynamic computational architecture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci***364,** 3459–3474 (2009).
- Scherma, M. *et al.* The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology* **54,** 129–140 (2008).
- Sesline, D., Ames, R. G. & Howd, R. A. Irritative and systemic symptoms following exposure to Microban disinfectant through a school ventilation system. *Arch. Environ. Health* **49,** 439–444 (1994).
- Slotkin, T. A., Skavicus, S. & Seidler, F. J. Prenatal drug exposures sensitize noradrenergic circuits to subsequent disruption by chlorpyrifos. *Toxicology***338,** 8–16 (2015).
- Sophie Crèvecœur et Suzanne Rémy. Evaluer l'exposition des enfants aux pesticides, tout un défi ! Période : décembre 2013 à mars 2014 | s.crevecoeur@issep.be Institut scientifique de service public (ISSeP) – Direction des risques chroniques, cellule environnement-santé – Liège – Belgique, Bulletin de veille scientifique de l'Anses n°24, 2014.
- Sultatos, L. G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J Toxicol Environ Health* **43,** 271–289 (1994).
- Sultatos, L. G., Shao, M. & Murphy, S. D. The role of hepatic biotransformation in mediating the acute toxicity of the phosphorothionate insecticide chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***73,** 60–68 (1984).
- Tait, S. *et al.* Long-term effects on hypothalamic neuropeptides after developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environ. Health Perspect.***117,** 112–116 (2009).

- Timchalk, C. et al. A Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. Toxicol. Sci. 66, 34–53 (2002).
- Timchalk, C., Busby, A., Campbell, J. A., Needham, L. L. & Barr, D. B. Comparative pharmacokinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos and its major metabolites diethylphosphate, diethylthiophosphate and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the rat. *Toxicology* **237,** 145–157 (2007).
- Timchalk, C., Poet, T. S. & Kousba, A. A. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. Toxicology 220, 13–25 (2006).
- Timofeeva, O. A. *et al.* Persistent Behavioral Alterations in Rats Neonatally Exposed to Low Doses of the Organophosphate Pesticide, Parathion. *Brain Res Bull* **77,** 404–411 (2008).
- Timofeeva, O. A., Roegge, C. S., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. & Levin, E. D. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. *Neurotoxicol Teratol* **30,** 38–45 (2008).
- Trezza V, Damsteegt R, Manduca A, et al. (2012). Endocannabinoids in amygdala and nucleus accumbens mediate social play reward in adolescent rats. *The Journal of Neuroscience*. 32(43). 14899-14908.
- Trunnelle, Kelly J.; Bennett, Deborah H.; Tulve, Nicolle S.; Clifton, Matthew Scott; Davis, Mark D.; Calafat, Antonia M.; Moran, Rebecca; Tancredi, Daniel J.; Hertz-Picciotto, Irva (2014-02-04). Urinary pyrethroid and chlorpyrifos metabolite concentrations in northern California families and their relationship to indoor residential insecticide levels, part of the study of use of products and exposure related behavior (SUPERB). Environmental Science & Technology. 48 (3): 1931–1939. doi:10.1021/es403661a. ISSN 0013-936X. Retrieved 2014-07-21.
- *U.S. EPA (2011-06-30). Chlorpyrifos Preliminary Human Health Risk Assessment for Registration RECIW (PDF) (Report). Retrieved 2014-07-24. https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/revised-human-health-risk-assessment-chlorpyrifos*
- U.S. EPA, Office of Pesticide Programs (2002-02). "Chlorpyrifos Facts". Retrieved 2014-07

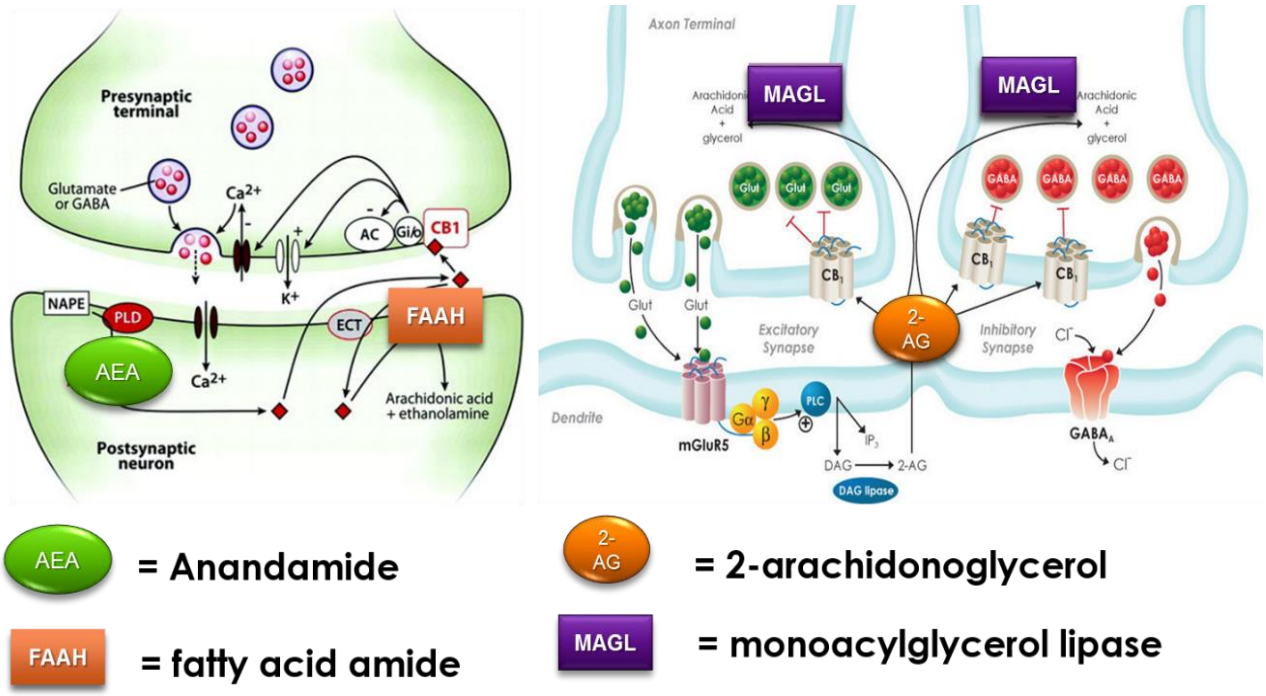
- Valverde, O. Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behaviour. *Curr. Pharm. Des.* **11,** 3421–3429 (2005).
- Vanderschuren, L. J. M. J., Achterberg, E. J. M. & Trezza, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev* **70,** 86–105 (2016).
- Vanderschuren, L. J. M., Niesink, R. J. M., Spruijt, B. M. & Van Ree, J. M. Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats. *Physiology & Behavior* **58,** 119–123 (1995).
- Venerosi, A. *et al.* Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring - a mouse study. *Environ Health* **14,** 32 (2015).
- Venerosi, A. *et al.* Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicol Teratol* **30,** 468–474 (2008).
- Venerosi, A., Calamandrei, G. & Ricceri, L. A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. Neurotoxicol Teratol 28, 466–471 (2006).
- Venerosi, A., Ricceri, L., Rungi, A., Sanghez, V. & Calamandrei, G. Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social-emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* **208,** 99–107 (2010).
- Viveros, M. P., Marco, E. M. & File, S. E. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **81,** 331–342 (2005).
- Wei D, Lee D, Cox CD, Karsten CA, Peñagarikano 2, Geschwind DH, Gall CM, Piomelli D Endocannabinoid signaling mediates oxytocin-driven social reward.
  Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Nov 10;112(45):14084-9. doi: 10.1073/pnas.1509795112. Epub 2015 Oct 26.
- Whyatt, R. M. & Barr, D. B. Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ. Health Perspect.* **109,** 417–420 (2001).
- Whyatt, R. M. *et al.* Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **206,** 246–254 (2005).

- Wotjak, C. T. Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem* **5,** 659–670 (2005)..
- Wu, C.-S. *et al.* Long-term consequences of perinatal fatty acid amino hydrolase inhibition. *Br. J. Pharmacol.* **171,** 1420–1434 (2014).
- Wu, C.-S., Jew, C. P. & Lu, H.-C. Lasting impacts of prenatal cannabis exposure and the role of endogenous cannabinoids in the developing brain. *Future Neurol* **6,** 459–480 (2011)..
- Wu, D.-F. *et al.* Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J. Neurochem.***104,** 1132–1143 (2008).
- Zanettini, C. *et al.* Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci* **5,** 57 (2011).
- Zheng, Q., Olivier, K., Won, Y. K. & Pope, C. N. Comparative cholinergic neurotoxicity of oral chlorpyrifos exposures in preweanling and adult rats. *Toxicol. Sci.* **55,** 124–132 (2000).

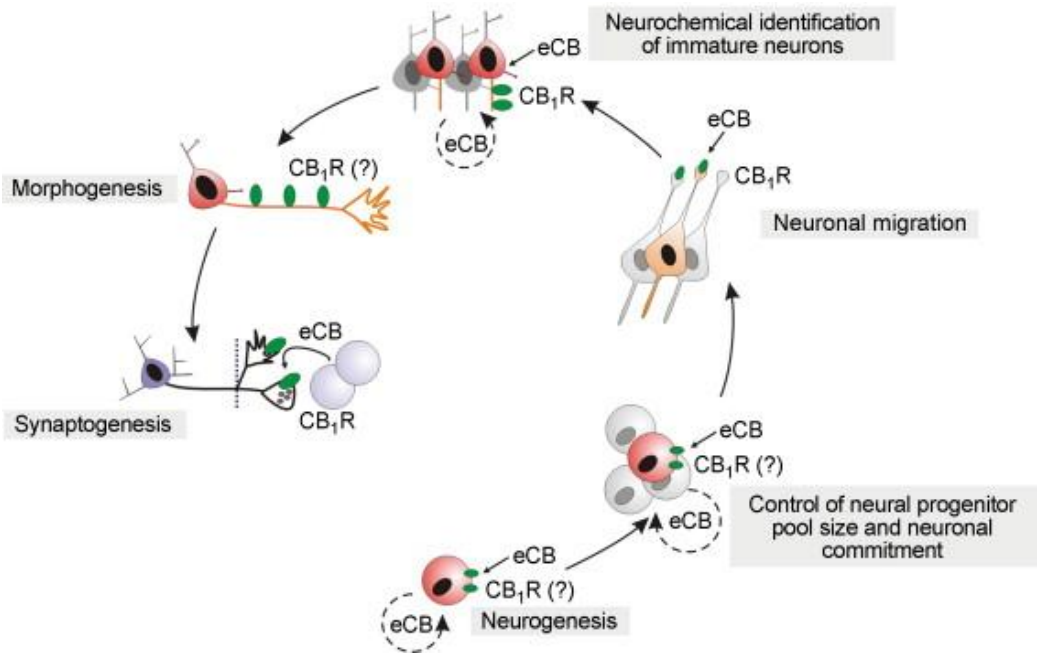
Annexes



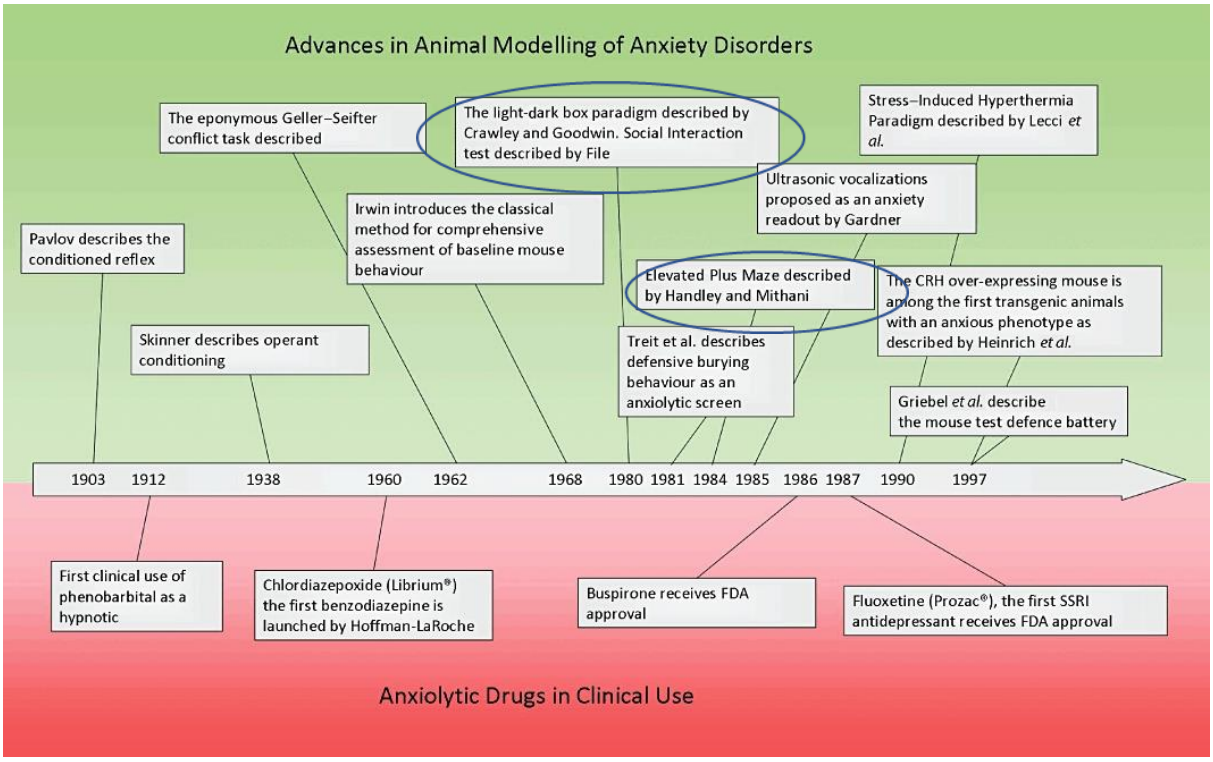
Annexe 1. Le métabolisme des deux principaux endocannabinoïdes, 2-arachydonoglycérol et anandamine (Endocannabinoids and their primary hydrolases relative to the action of OP nerve agents, nature.com)



Annexe 2. Métabolisme des endocannabinoïdes au niveau des synapses et voies de transmission cellulaire (The Hempchronicle, NeuroWiki)

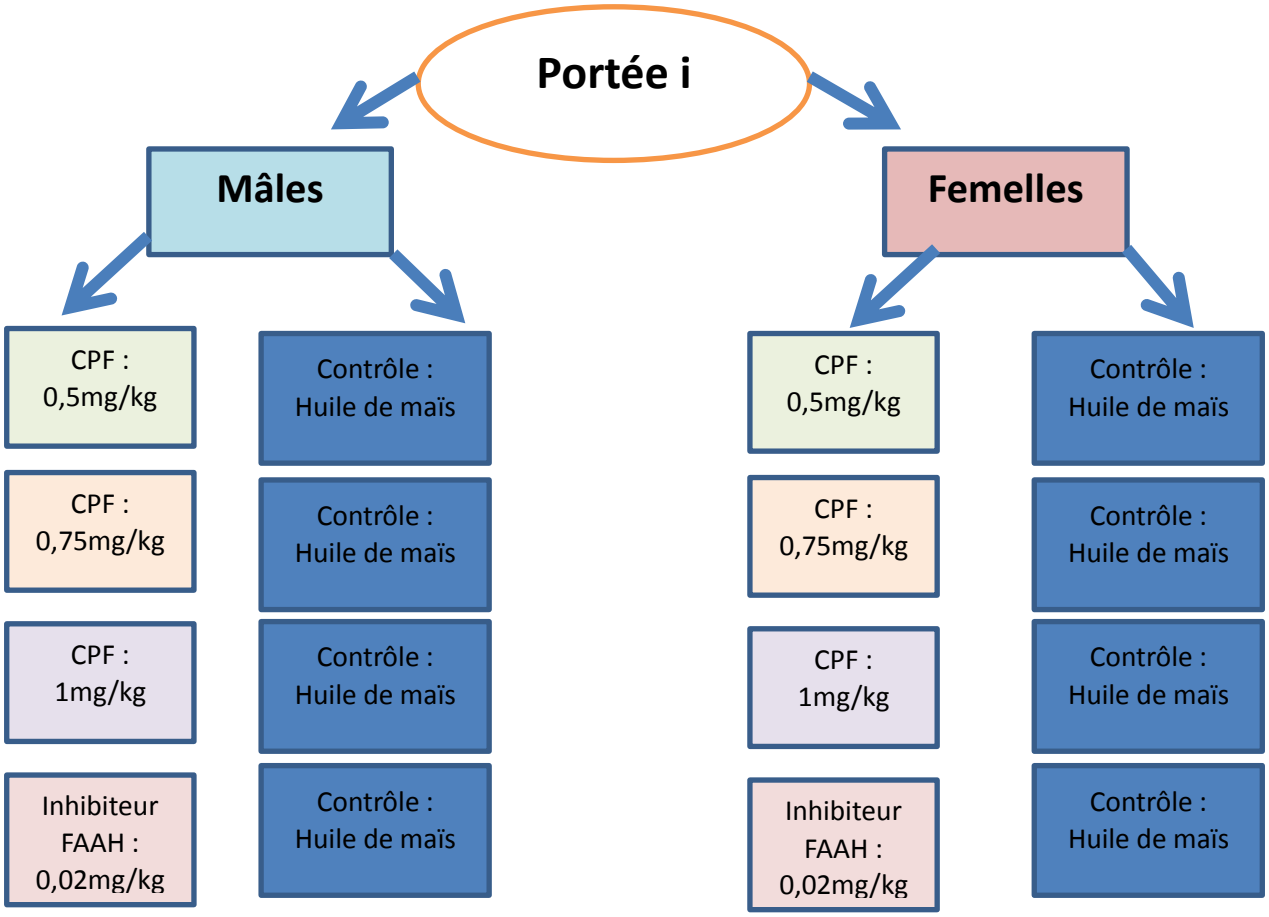


Annexe 3. La différenciation neuronale est contrôlée par les endocannabinoïdes (eCB) agissant sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 (CB1R, ovales verts). Les flèches solides indiquent l'implication probable d'actions d'EC; Tandis que les flèches circulaires désignent des mécanismes cellulaires vraisemblables par l'expression intrinsèque de DAGL et la libération régulée d'EC. Des points d'interrogation pointent vers des données existantes suggérant l'implication d'autres récepteurs capables de détecter les cannabinoïdes (CB2R, GPR55) au cours d'étapes particulières de développement neuronal
(Harkany, 2008)

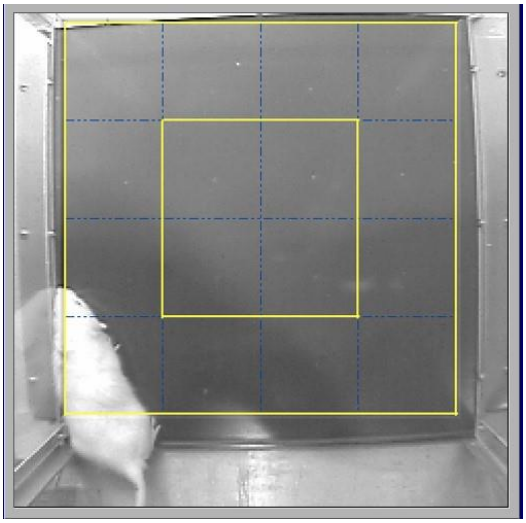


Annexe 4. Modèles animaux et test liés aux troubles de l'anxiété (Cryan, 2011)

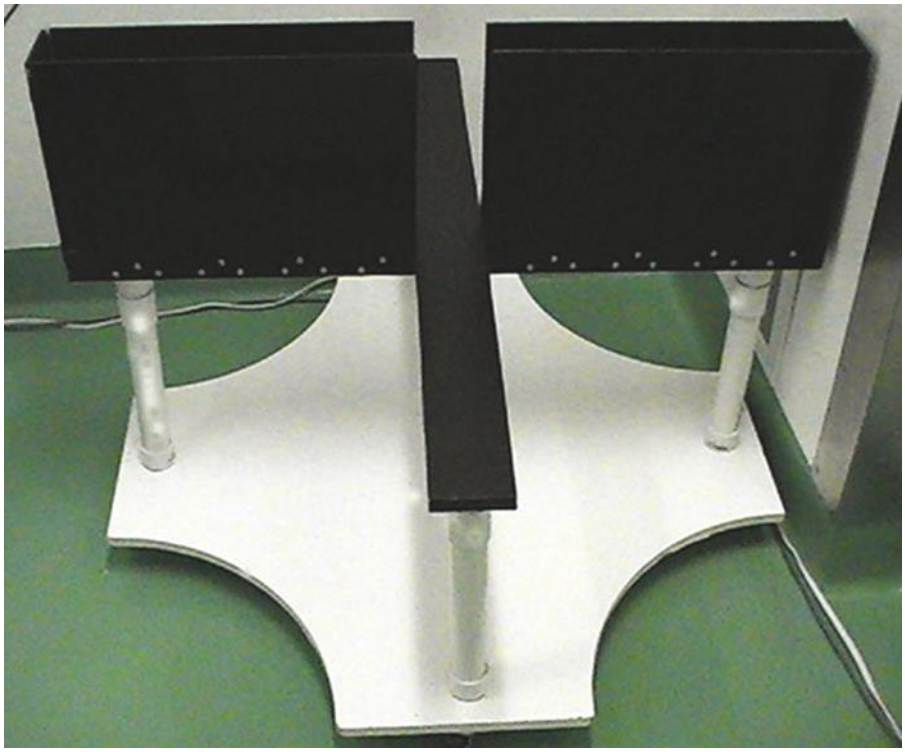
Annexe 5. Marquage du dos et de la queue des différents groupes de traitement (photographie personnelle).



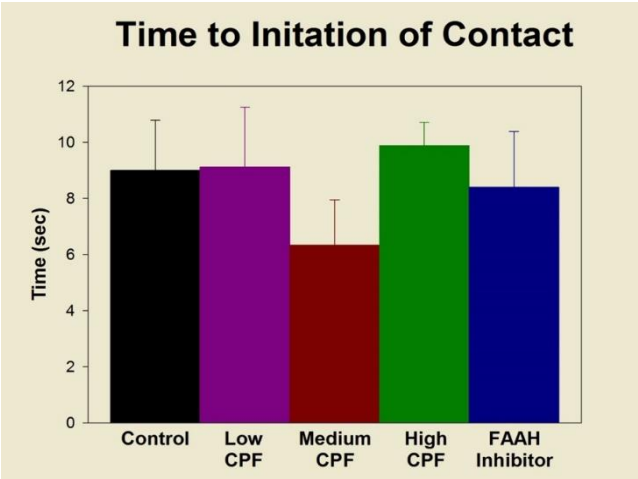
Annexe 6. Pour une portée i, répartition des rats nouveaux nés dans les différents groupes de traitement de CPF (huile de maïs : groupe contrôle, 0,5mg/kg ; 0,75 mg/kg ; 1mg/kg de chlorpyrifos ; 0.02mg/kg de l'inhibiteur de la FAAH, PF-04457845) de PND10 à PND 16.



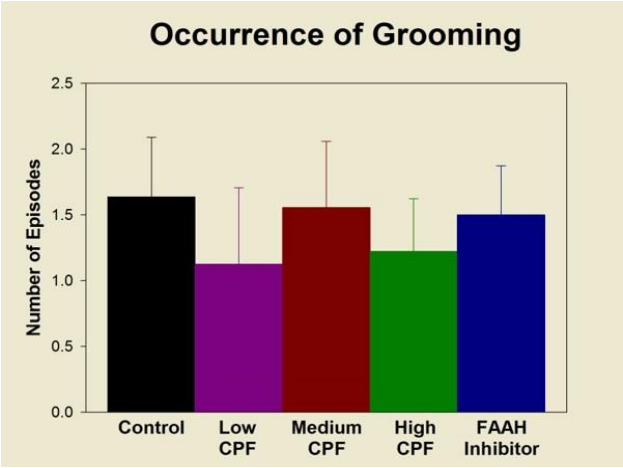
Annexe 7. Test du « champ ouvert » ou « open field » et modélisation de la grille par le logiciel de suivi de locomotion (photographie personnelle).



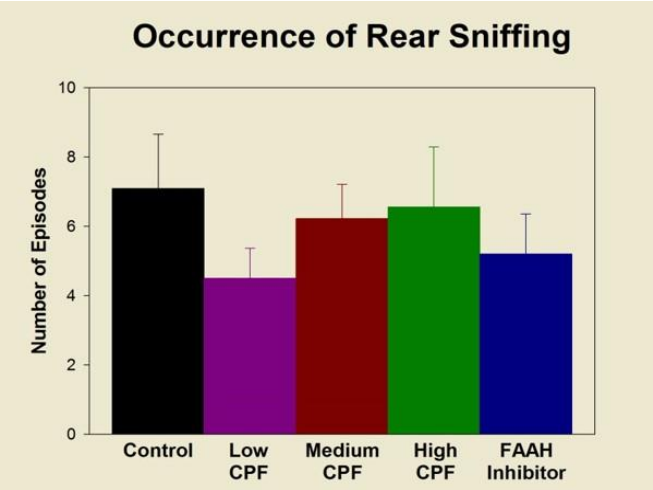
Annexe 8. Labyrinthe en croix surélevé
(photographie personnelle).



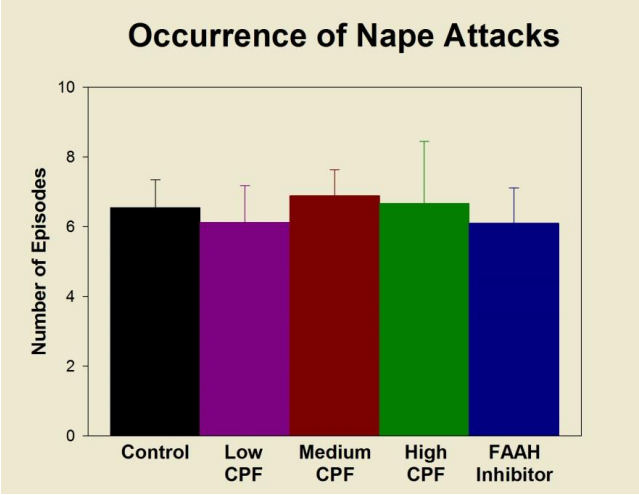
Annexe 9. Temps d'initiation de la première interaction en fonction des différents traitements



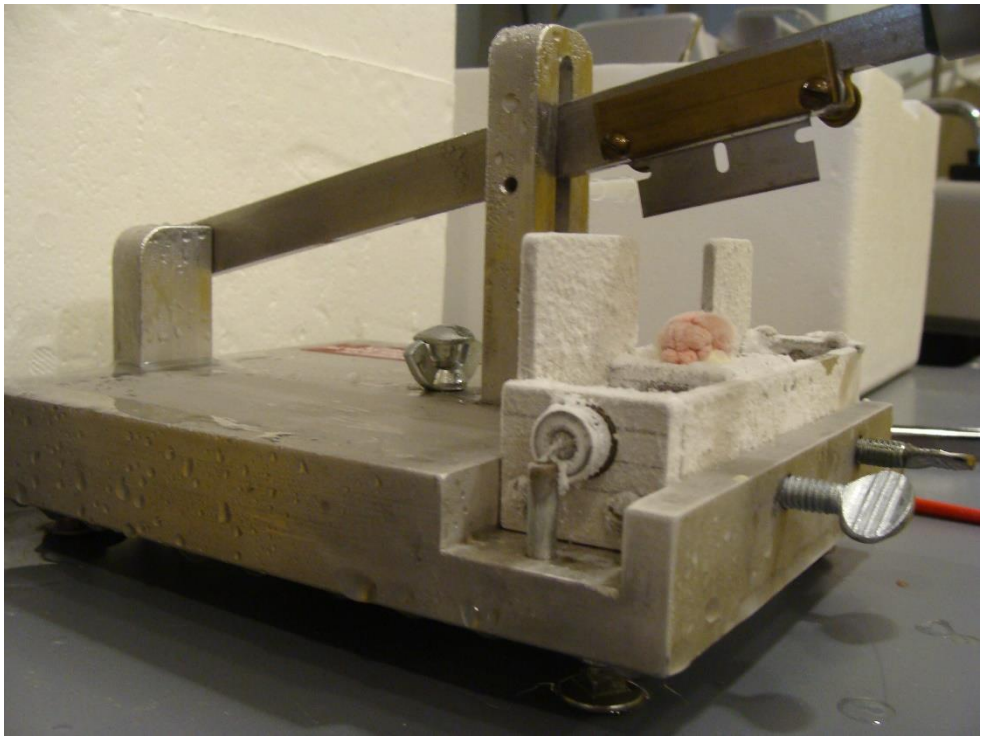
Annexe 10. Fréquence de toilettage en fonction des différents traitements



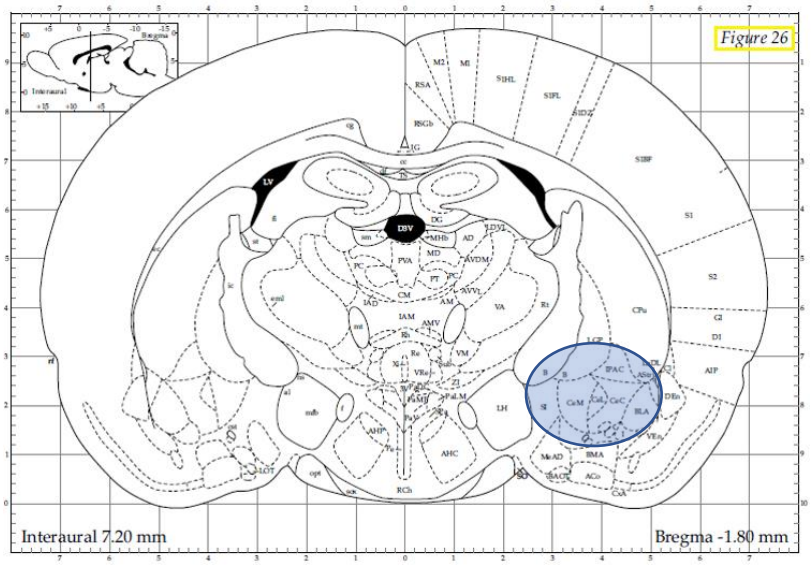
Annexe 11. Fréquence de reniflement de la région péri-anale en fonction des différents traitements



Annexe 12. Fréquence d' « attaque de la nuque » en fonction des différents traitements



Annexe 13. Vibratome servant aux coupes de prosencéphale de rat.(photographie personnelle).



Annexe 14. Région du cerveau dont l'amygdale est extraite, la région correspondant au tissu collecté pour l'amygdale est entourée sur la coupe transversale.

Nom : LOYANT

Prénom : Louise

Titre : ***Neurotoxicite développementale du chlorpyrifos via le système endocannabinoïde : effets comportementaux chez le rat.***

Résumé : Le chlorpyrifos (CPF), pesticide agricole, est suspecté de neurotoxicité chez les enfants. Cet effet, observé suite à une exposition développementale à faible dose reposerait sur l'inhibition de l'hydrolase des amides d'acides gras du système des endocanabinoïdes (FAAH, *fatty acid amide hydrolase*). Des rats Sprague-Dawley ont été exposés, en période postnatale (PND10 à PND 16) soit au CPF à 0.5, 0,75 et 1 mg/kg/j, soit à un inhibiteur spécifique de la FAAH (PF-04457845). Les rats traités avec le CPF ont montré une diminution de l'anxiété et une augmentation des comportements sociaux, comme ceux traités par PF-04457845, suggérant l'implication de la FAAH dans les effets comportementaux du CPF. Les valeurs toxicologiques de référence utilisées pour évaluer les risques sanitaires du CPF devraient prendre pas en compte la sensibilité particulière pendant le développement, ce qui permettrait d'assurer une meilleure protection de la santé des enfants.

Mots clés: chlorpyrifos – pesticide – neurotoxicité développementale – comportement – rat – système endocannabinoïde - FAAH

Last Name: LOYANT

First Name: Louise

Title: ***Developmental neurotoxicity of the chlorpyrifos via the endocannabinoid system: behavioural effects in rats.***

Abstract: Chlorpyrifos (CPF), an agricultural pesticide, is suspected of neurotoxicity in children. This effect, observed following a low level developmental exposure, would be based on the fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. Sprague-Dawley rats were exposed to CPF at 0.5, 0.75 and 1 mg / kg / day in the postnatal period (PND10 to PND 16) or to a specific FAAH inhibitor (PF-04457845). Rats treated with CPF showed decreased anxiety and increased social behaviors, such as those treated with PF-04457845, suggesting the involvement of FAAH in the behavioral effects of CPF. The toxicological reference values used to assess the health risks of the CPF should take into account the particular sensitivity during development, which would ensure better protection of children's health.

Keys Words: chlorpyrifos – pesticide – developmental neurotoxicity – behaviour – rat – endocannabinoid system - FAAH