



HAL
open science

Neurotoxicologie développementale de l'exposition gestationnelle aux particules de fumées de diesel chez le lapin : caractérisation des effets sur l'activité de la cytochrome oxydase et l'acétylcholinestérase en tant que marqueurs de la fonctionnalité cérébrale

Benoît Olivier

► To cite this version:

Benoît Olivier. Neurotoxicologie développementale de l'exposition gestationnelle aux particules de fumées de diesel chez le lapin : caractérisation des effets sur l'activité de la cytochrome oxydase et l'acétylcholinestérase en tant que marqueurs de la fonctionnalité cérébrale. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297942

HAL Id: hal-03297942

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297942>

Submitted on 23 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



FACULTÉ
DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
2019

FACULTÉ DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 18 septembre 2019, sur un sujet dédié à :

**« Neurotoxicologie développementale de l'exposition
gestationnelle aux particules de fumées de diesel chez le lapin :
caractérisation des effets sur l'activité de la cytochrome oxydase et
de l'acétylcholinestérase en tant que marqueurs de la
fonctionnalité cérébrale. »**

pour obtenir

le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

par Benoit OLIVIER

né le 5 juin 1993

Membres du Jury

Président : M. Olivier JOUBERT

Maître de Conférences habilité à diriger des recherches

Juges : M. Henri SCHROEDER
M. François DUPUIS
M. Laurent GATE

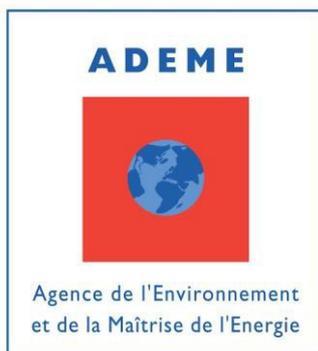
Maître de Conférences habilité à diriger des recherches
Maître de Conférences habilité à diriger des recherches
Responsable Laboratoire CMR

La réalisation de cette thèse a été rendue possible par les financements de

L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Alimentation, Environnement, Travail (ANSES)



et l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME)



**UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2018-2019**

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Marie-Paule SAUDER

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Dominique DECOLIN

Communication

Innovation pédagogique

Référente ADE

Référent dotation sur projet (DSP)

Responsabilités

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

Filière Officine

Filière Industrie

Filière Hôpital

Pharma Plus ENSIC

Pharma Plus ENSAIA

Pharma Plus ENSGSI

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Commission d'agrément des maîtres de stage

ERASMUS

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Claude VIGNERON

-

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Chantal FINANCE
 Marie-Madeleine GALTEAU
 Thérèse GIRARD
 Michel JACQUE
 Pierre LABRUDE
 Vincent LOPPINET
 Alain NICOLAS
 Janine SCHWARTZBROD
 Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
 Annie PAVIS

Mariette BEAUD
 François BONNEAUX
 Gérald CATAU
 Jean-Claude CHEVIN
 Jocelyne COLLOMB
 Bernard DANGIEN
 Marie-Claude FUZELLIER
 Françoise HINZELIN
 Marie-Hélène LIVERTOUX
 Bernard MIGNOT
 Blandine MOREAU
 Dominique NOTTER
 Francine PAULUS
 Christine PERDICAKIS
 Marie-France POCHON
 Anne ROVEL
 Gabriel TROCKLE
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU
 Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Économie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Épidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPPEL	82	Biothérapie

Marie SOCHA 81 *Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Sandrine CAPIZZI BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Reine EL OMAR	86	<i>Physiologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

*Section CNU**

ENSEIGNANTS (suite)

		<i>Discipline d'enseignement</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Épidémiologie et Santé publique</i>
Arnaud PALLOTTA	86	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Marianne PARENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

PROFESSEURS ASSOCIES

Julien GRAVOULET	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTÉ N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A
LEUR AUTEUR ».

Remerciements :

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Olivier Joubert pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse et d'avoir accepté d'examiner la qualité de ce manuscrit.

Je tiens à remercier également le Dr Henri Schroeder d'avoir accepté la direction de cette thèse. J'espère que qu'il sera fier de ce travail. Je lui adresse mon plus grand respect et ma sincère gratitude.

Je remercie les Dr François Dupuis et Dr Laurent Gaté pour l'honneur qu'ils me font d'être comptés parmi les membres du jury.

Je tiens à adresser également mes remerciements au Pr Jean-Luc Olivier qui m'a permis d'effectuer cette thèse d'exercice au sein de l'unité CALBINOTOX (Composés Alimentaires, Biofonctionnalités et Risques Neurotoxiques, EA7488) de l'Université de Lorraine.

Merci également à Madame Pascaline Bouillaud, Maître de Conférences, elle a su me prodiguer de nombreux conseils relatifs aux neurosciences et m'a transmis sa passion pour celles-ci. Elle s'est toujours montrée disponible et attentive à mes besoins, mais aussi très pédagogue.

Je n'oublie pas Madame Estefania Bernal Melendez qui a contribué aussi à faire de cette thèse une expérience agréable et très enrichissante. Tu as été un soutien indispensable pour moi et ton énergie débordante, ta joie de vivre, nos discussions sur tout et rien, les pauses du midi m'ont permis de penser à autre chose que la thèse. Un grand merci pour ton aide et tes relectures.

Le plus grand des mercis va à mes parents. Votre soutien a été sans faille, malgré mes doutes, mes peurs et les périodes difficiles. Depuis toujours, vous me donnez la force d'avancer, de croire en moi. Vous m'avez toujours poussé à accomplir ce en quoi je croyais, sans jamais vous interposer, et aujourd'hui j'espère vous rendre fiers.

Un grand merci à mes grands-parents pour leur soutien, leurs conseils et leur confiance en moi. Merci d'être à mes côtés pour m'aider à avancer et pour m'expliquer ce qu'est la vie dans son intégralité.

Merci à Alexandre, mon binôme durant toutes ces années, pour tant de souvenirs qui resteront ancrés dans ma mémoire.

Merci Laetitia : tu as toujours su être là lorsque j'ai eu besoin de toi notamment pour la réalisation de cette thèse.

Merci à Christine pour ton soutien et ta patience durant les relectures de cette thèse, afin de traquer la moindre petite faute.

Merci à Agathe pour ce que tu es, pour ton soutien et ta patience face à mes doutes. Tu as su être là pour me reconforter quand j'en avais le plus besoin ; tu m'aides à avancer et me remontes le moral avec une facilité déconcertante à chaque fois.

Merci à Pierre Antoine et Marie d'avoir été là durant ces derniers mois.

Merci à Gilles pour nos échanges sur le sujet de cette thèse qui m'ont apporté des idées afin d'être le plus complet possible.

Un énorme merci à mes amis pour leur soutien inestimable tout au long de la thèse et depuis des années. Je pense notamment à Jeremy, Jennifer, Aline, Carole, Jeremy, Sofiène, Nicolas, Lenny, Alexandre, Clarisse et bien d'autres.

Ma dernière pensée va à ma grand-mère.

Liste des abréviations :

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, alimentation, environnement, travail

ATP : Adénosine Triphosphate

BHE : Barrière hématoencéphalique

CA : Corne d'Amon

CAFE : Clean Air For Europe

CAH : Composés aromatiques hétérocycliques

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CO : Monoxyde de Carbone

CO₂ : Dioxyde de Carbone

EPAPP : Effets de la Pollution Atmosphérique sur la fonction Placentaire et le développement Post-natal

ESM : Erreur Standard à la Moyenne

GD : Gestational Day

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HBCDD : HexaBromoCycloDoDecane

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

IGF-1: Insulin-like growth factor-1

IL : Interleukine

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

InVS : Institut de Veille Sanitaire

MAPCEL : Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory

NOx : Oxydes d'azote

OMS : Organisation mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations Unies

PFD : Particules de Fumées de Diesel

PM: Particulate Matter

PND: Postnatal Day

PNSE : Plan National Santé Environnement

Psas : Programme de surveillance air et santé

SNC : Système Nerveux Central

SO₂ : Dioxyde de Soufre

UCEA : Unité Commune d'Expérimentation Animale

UE : Union Européenne

UFPM : Ultrafine Particulate Matter

USEPA : United States Environmental Protection Agency

2-NBT : 2-méthyl-but-2-éna

Liste des Figures :

Figure 1 : Représentation graphique de la taille relative des particules et trajet au sein du tractus pulmonaire.	7
Figure 2 : Évolution des ventes de diesels sur les 26 dernières en France et représentation du parc automobile français.	10
Figure 3 : Représentation graphique et comparaison des différents types d'émissions rejetées par les voitures essence et diesel.	10
Figure 4 : Composition chimique d'une particule de diesel.....	12
Figure 5 : Récapitulatif des valeurs limites, des seuils et des objectifs de qualité pour différents polluants atmosphériques en Europe.....	15
Figure 6 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD chez l'animal	24
Figure 7 : Impact de la pollution atmosphérique sur le cerveau à travers différentes voies d'exposition.....	33
Figure 8 : Dispositif MAPCEL et les différents paramètres de mesure	41
Figure 9 : Protocole d'exposition et temps des prélèvements des échantillons de tissu nerveux (Système olfactif et cerveau).....	43
Figure 10 : Représentation du plan de coupe des cerveaux de lapins adultes.	46
Figure 11 : Illustration des différents marquages appliqués aux coupes de cerveaux de lapins adultes.....	46

Liste des Tableaux :

Tableau I : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des systèmes sensoriels.	54
Tableau II : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissu) au niveau du système moteur.....	55
Tableau III : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (tronc cérébral, thalamus, hypothalamus, et système limbique) et de leurs cortex associés.	56
Tableau IV : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (hippocampe, amygdale et habenula) et de leurs cortex associés.....	57
Tableau V : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des systèmes sensoriels.	60
Tableau VI : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau du système moteur.....	61
Tableau VII : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (hippocampe, thalamus) et de leurs cortex associés.	62
Tableau VIII : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (système limbique et amygdale).....	63
Tableau IX : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (système limbique et hypothalamus).....	64

Table des matières

Partie I – La pollution atmosphérique de type particulaire est un enjeu majeur en Santé publique.

1. Généralités sur la pollution atmosphérique.....	3
1.1. Les polluants de l'air.....	3
1.1.1. La fraction gazeuse.....	4
1.1.2. La fraction particulaire	5
1.2. Origines de la pollution atmosphérique	8
1.2.1. Le trafic routier	8
1.2.2. Autres sources de pollution atmosphérique	8
2. Le moteur diesel pointé du doigt pour sa possible implication dans la toxicité environnementale	9
2.1. Composition des gaz d'échappement de moteur diesel	9
2.2. Les dangers en lien avec le diesel	13
3. Les dispositifs mis en œuvre face à la pollution atmosphérique	14
3.1. Réglementations et recommandations	14
3.1.1. A l'échelle mondiale.....	14
3.1.2. A l'échelle européenne et française.....	16
3.2. Objectifs et actions contre les rejets polluants de l'air	16

Partie II – Les méfaits et le questionnement légitime sur les particules issues du moteur diesel

1. Les divers effets nocifs des particules issues des fumées de diesel	19
1.1. La contribution des particules fines aux neuropathologies	19
1.2. L'exposition précoce à la pollution de l'air due aux particules fines serait neurotoxique	21
2. Les découvertes issues des études expérimentales sur l'animal	23
2.1. Des atteintes neurocomportementales chez la progéniture	23
2.2. Des observations à prendre avec beaucoup de précaution	26
2.2.1. Des conditions d'exposition multiples qui ne permettent pas de réelles comparaisons	26
2.2.2. Le choix du modèle animal déterminant pour l'interprétation des résultats.....	26

Partie III - L'individu en développement : une population à risque

1. Sensibilité particulière de l'organisme au stade fœtal.....	28
2. Le transfert des particules entre la mère et le fœtus	30
2.1. Les particules inhalées peuvent atteindre le cerveau fœtal via les voies olfactives et systémiques.....	30
2.2. Le passage de la barrière hémato-encéphalique fœtale.....	31
3. Les dommages causés par les particules peuvent bouleverser le fonctionnement neuronal du fœtus	32
4. La politique mise en place pour protéger l'individu en développement	34

Matériels & Méthodes

1. Expérimentation animale	38
1.1. Procédure expérimentale d'exposition	38
1.2. Le choix du modèle expérimental	38
1.3. Matériels et conditions d'exposition mis en place	39
2. Démarche expérimentale	42
2.1. Exploration des fonctions cérébrales	44
2.1.1. Analyse histochimique de l'activité métabolique neuronale via la cytochrome oxydase	44
2.1.2. Principe de l'analyse histochimique via la cytochrome oxydase	44
2.1.3. Procédure de préparation	45
2.1.4. Marquage et analyse des tissus	45
2.1.5. Quantification de l'activité de la cytochrome oxydase	47
2.1.6. Analyses statistiques de la cytochrome oxydase	47
2.2. Exploration des fonctions cérébrales	47
2.2.1. Analyse histochimique de l'activité cholinergique cérébrale	47
2.2.2. Principe de l'analyse histochimique via l'AChE	48
2.2.3. Marquage et analyse des tissus marqués à l'AChE	48
2.2.4. Quantification de l'activité de l'AChE	49
2.2.5. Analyses statistiques de l'AChE	50

Résultats

1. Analyses histologiques de la cytochrome oxydase	51
1.1. Systèmes sensoriels	51
1.2. Système moteur	51
1.3. Régions sous corticales et cortex associés	52
2. Analyses histologiques de l'AChE	58
2.1. Systèmes sensoriels	58
2.2. Système moteur	58
2.3. Régions sous corticales et cortex associés	59

Discussion

1. Effets des polluants environnementaux d'après l'analyse histochimique	65
2. Effets de polluants environnementaux sur le comportement	66
3. Effets de polluants environnementaux sur la neurochimie	67
4. Variations sexe-dépendantes suite à l'exposition gestationnelle aux PFD	68
5. Pertinence et limitations de l'étude	69
5.1. Choix du modèle lapin	69
5.2. L'exposition « nose-only », la meilleure alternative pour s'approcher des conditions humaines	70
5.3. Les PFD ne semblent pas être la seule source aux effets neurodéveloppementaux observés	71
6. Rapport final sur le projet BrainAirPoll	72

Conclusion générale et perspectives

Partie I – La pollution atmosphérique de type particulaire est un enjeu majeur en Santé publique

1. Généralités sur la pollution atmosphérique

Selon un communiqué de presse de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) publié en 2014, la pollution atmosphérique est un problème de santé publique primordial ayant causé 3,7 millions de décès prématurés dans le monde en 2012 (OMS 2014). Compte tenu de l'augmentation de l'activité humaine générant ce type de pollution, il est déterminant de prendre en considération ce problème sous-évalué de nos jours et qui ne peut que s'amplifier au cours des années à venir, posant la question du risque pour la santé des générations futures. Dans ce contexte, les données expérimentales et épidémiologiques disponibles suggèrent que l'exposition à différents polluants environnementaux au cours de la phase précoce du développement que constituent la grossesse et l'allaitement, est à même d'induire à l'âge adulte des troubles neurocomportementaux et neurodégénératifs qui peuvent être préjudiciables à la santé de l'individu. En revanche, des études restent à réaliser sur les effets de l'exposition indirecte du fœtus via la mère gestante aux particules environnementales et la pollution atmosphérique sur le développement cérébral et le devenir de l'individu.

Afin de réaliser ces études, il est nécessaire de prendre en compte les différents polluants environnementaux ainsi que les voies d'administration les plus adaptées au modèle d'étude par exemple, les polluants de l'air.

1.1. Les polluants de l'air

Les polluants atmosphériques sont classés en deux catégories : les polluants primaires, qui peuvent être émis par les activités humaines et les polluants secondaires qui eux, découlent de réactions chimiques entre gaz atmosphériques.

Les polluants primaires regroupent les oxydes d'azote (NO_x), le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de soufre (SO_2), les composés volatiles organiques et les particules primaires carbonneuses et non carbonneuses. Les polluants primaires sont dégagés dans l'atmosphère par diverses sources telles que les cheminées des usines ou les systèmes d'échappement des véhicules. De plus, il est envisageable de quantifier leurs émissions afin d'établir un recensement de leurs différentes origines.

Les polluants secondaires, eux, proviennent de réactions chimiques entre certains polluants primaires et l'atmosphère, impliquant généralement des composants naturels comme l'oxygène et l'eau. Parmi cette catégorie de polluants, on retrouve les NO_x , les particules secondaires et l'ozone. Du fait de leur mode de formation aléatoire, ce type de polluants ne peut être utilisé pour dresser une liste de leurs sources d'émissions.

Dès lors on peut concevoir la pollution atmosphérique comme un mélange complexe formé d'une fraction gazeuse, principalement issue de l'utilisation de combustibles fossiles (gaz, pétrole et charbon de bois), d'une fraction liquide et d'une fraction particulaire en suspension, constituée d'agglomérats de particules solides présentes dans l'atmosphère. L'origine des émissions peut être naturelle (éruptions volcaniques, décomposition de matières organiques, incendies de forêt...) ou anthropique (transport, industrie, agriculture, chauffage résidentiel).

C'est pourquoi, selon les sources d'émissions, la nature des composés et les transformations encourues, la pollution de l'air constitue une problématique difficile à évaluer et à traiter, et doit être prise en considération à différents échelons. Ainsi, chaque composé est généralement classé par famille selon une réglementation particulière, par rapport à des caractéristiques physico-chimiques communes ou suivant les effets qu'il peut induire chez l'homme et l'animal (CITEPA, 2015).

1.1.1. La fraction gazeuse

Il s'agit de l'ozone troposphérique. Depuis plusieurs années maintenant, il est considéré comme un des problèmes de pollution atmosphérique les plus répandus au niveau mondial. On note des différences de concentration d'ozone importante au sein des zones urbaines, mais aussi dans leurs alentours (W.H.O 2006). Ces variations s'expliquent par les réactions chimiques entre l'ozone et les NO_x émis dans ces zones. Dans celles fortement polluées comme les villes, l'acide nitrique émis par le trafic routier réagit spontanément avec l'ozone de l'atmosphère et diminue ainsi les quantités d'ozone mesurées dans ces zones géographiques. À noter que les réactions chimiques sont étroitement liées au rayonnement solaire, entraînant de grandes différences de concentrations d'ozone au niveau mondial.

Les NO_x sont des composants majeurs du « smog photochimique », un brouillard brunâtre épais causé par une réaction chimique entre un mélange de polluants atmosphériques (NO_x , composés organiques volatils, monoxyde carbone) en présence de rayonnements solaires limitant la visibilité dans l'atmosphère. Par exemple, le dioxyde d'azote

(NO₂) provient majoritairement du trafic routier, mais aussi, dans une moindre mesure, de l'industrie, du trafic maritime et des habitations. En Europe, la concentration moyenne en NO₂ dans l'air (mesure en zone urbaine, rurale ou industrielle) varie de 14 µg/m³ en Islande à 44 µg/m³ en France (Eerens *et al.*, 2005).

Enfin le dioxyde de soufre (SO₂) provient de la combustion des énergies fossiles. Depuis 2000 en Europe, Amérique du Nord et dans certaines parties de l'Asie, on note une diminution de la concentration en SO₂ dans l'air du fait de la diminution de l'utilisation de charbon. Toutefois, au nord de la Chine, le charbon reste une source d'énergie majeure produisant ainsi de fortes concentrations en SO₂. Entre 2000 et 2005, la concentration moyenne annuelle en SO₂ dans l'air dans des villes d'Asie, d'Europe, d'Afrique et d'Amérique du Nord et du Sud, avoisinait 20 µg/m³ pour 50% d'entre elles et dépassait 50 µg/m³ pour 15% d'entre elles (W.H.O 2006).

1.1.2. La fraction particulaire

Les polluants atmosphériques sont généralement classés selon leur taille. Cette classification est possible car les polluants sont composés de deux phases : une phase gazeuse et une phase particulaire. C'est cette phase particulaire qui est utilisée pour établir ce classement. Les particules peuvent être de taille très faible : par exemple inférieure à 100 nm de diamètre pour la phase particulaire ultrafine, plus importante pour les particules de poussières grossières qui s'approchent des 10 µm de diamètre, voire très importante pour les grosses particules pouvant atteindre 20 µm. Ces particules ont donc des tailles et des compositions chimiques très diverses dépendant de leurs sources d'émissions.

Les PM₁₀ (Particulate Matter 10) sont les particules ayant un diamètre inférieur à 10 µm. Elles sont souvent utilisées comme indicateur de la concentration particulaire atmosphérique. Leurs concentrations annuelles moyennes varient entre 35 et 220 µg/m³ en Asie (State Environmental Protection Administration 2002 ; Sivertsen 2004) et entre 30 et 129 µg/m³ en Amérique latine (Bourotte *et al.* 2005), tandis qu'en Europe et en Amérique du Nord elles sont moins étendues allant de 15 à 60 µg/m³ (CAFE Working Group on Particulate Matter 2004 ; Sivertsen & El Seoud 2004 ; US Environmental Protection Agency 2006, WHO, 2016)

La catégorie PM_{2,5} (Particulate Matter 2,5) regroupe les particules d'un diamètre inférieur à 2,5 µm. Ce groupe de particules est un bon indicateur des risques pour la santé causés par la pollution atmosphérique (W.H.O 2006). En raison de leur petit diamètre, ces

particules pénètrent profondément dans l'arbre bronchique et atteignent la circulation sanguine (Wichmann *et al.*, 2007 ; Figure 1). Aux États-Unis, en 2002, la concentration moyenne en $PM_{2,5}$ calculée à partir des concentrations de 125 villes de 75 000 à 9 millions d'habitants était de $12,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (US Environmental Protection Agency 2003). Récemment elle a été réévaluée aux alentours de $9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 2016). En Europe, la concentration annuelle en $PM_{2,5}$ sur des sites proches du trafic routier varie de 20 à $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$, alors qu'en zones rurales la moyenne tend entre 11 et $13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (CAFE, 2004).

Enfin, les particules ultrafines ou nanoparticules qui ne dépassent pas les 100 nm ne sont pas utilisées comme indicateurs des risques pour la santé et ne sont soumises à aucune réglementation particulière en raison du manque de données sur les niveaux d'exposition et des difficultés rencontrées pour les quantifier (Kappos *et al.*, 2004 ; WHO, 2013, 2014). Elles sont issues de la nucléation, phase initiale du processus de transformation d'un gaz en particule. Leur dimension peut changer via un processus de condensation (lorsque des composants gazeux se condensent à la surface de la particule) ou par coagulation (lorsque deux ou plusieurs particules s'agrègent pour en former une plus grosse). Il est important de noter que, pour un même volume donné, ces nanoparticules adsorbent une plus grande quantité de composés organiques et métalliques à leur surface par rapport aux grosses particules, ce qui a un impact direct sur leur niveau de toxicité (Ibald-Mulli *et al.*, 2002 ; Nel, 2005).

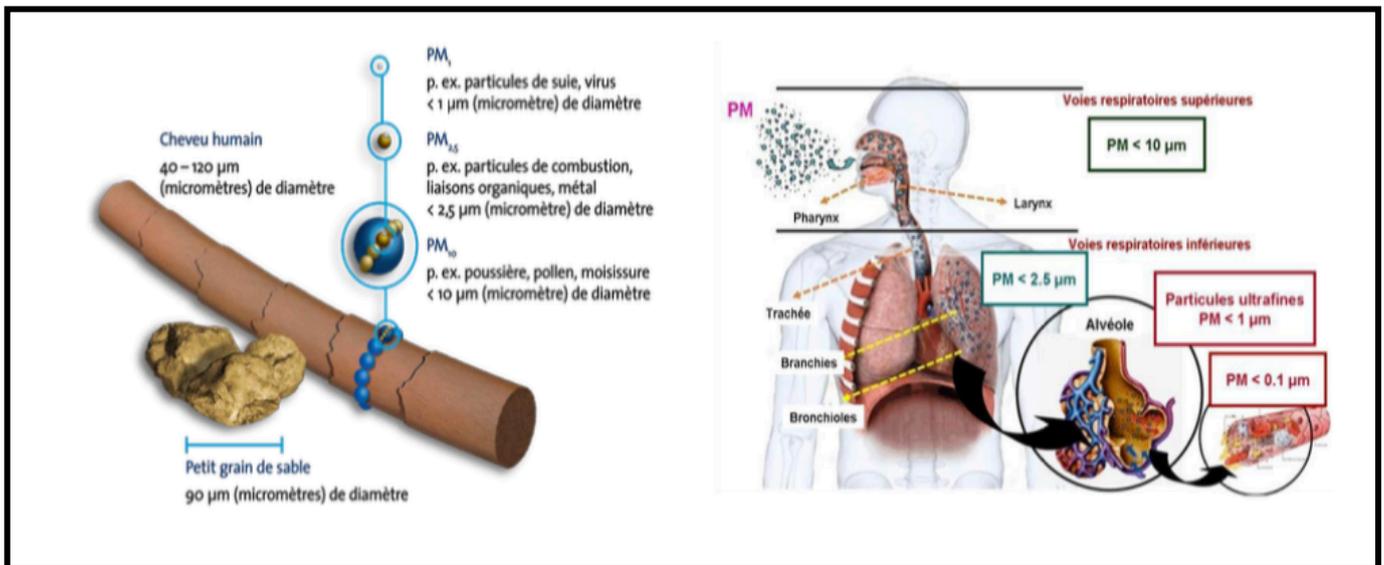


Figure 1: **Gauche.** Représentation graphique et comparaison de la taille relative des particules fines. Images issues de www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics **Droite.** Schéma mettant en évidence la facilité des particules à pénétrer le tractus pulmonaire et atteindre divers organes via la circulation sanguine en lien avec leur éventuelle toxicité. Image, issue de Bernal Melendez et al., 2019b.

1.2. Origines de la pollution atmosphérique

1.2.1. Le trafic routier

La principale source de pollution atmosphérique est le trafic routier, toutes émissions confondues, sans distinction de véhicules. Deux tiers des oxydes d'azote, ainsi que la moitié des PM₁₀ et des PM_{2,5} en sont issus. Les émetteurs primaires sont majoritairement les gaz d'échappement, mais aussi les évaporations de gasoil et surtout d'essence (Ghio *et al.*, 2012).

Les gaz d'échappement de diesel contiennent plus de 40 polluants atmosphériques toxiques. Parmi ceux-ci, une part importante correspond aux particules et plus précisément aux particules ultrafines (UFPM). En raison de leur petite taille, ces particules présentent des propriétés particulières telles qu'un rapport surface/volume très élevé et une surface d'échange augmentée (Linse *et al.*, 2007). De plus, leur surface, plus réactive, leur permet de se lier facilement à d'autres toxines dans l'environnement. Les PFD (Particules des Fumées de Diesel) s'avèrent donc être un polluant majeur de l'air (Donaldson *et al.*, 2005 ; Costa *et al.*, 2014).

1.2.2. Autres sources de pollution atmosphérique

La combustion d'énergies fossiles dans les centrales de combustion est la seconde source d'émission polluante dans de nombreux pays industrialisés (News 2015; Petitjean 2016). Cette combustion à haute température crée du SO₂ et des NO_x, en cas de présence de soufre dans le combustible, ainsi que des composés organiques volatiles provenant surtout de la combustion partielle du charbon et du pétrole.

Une troisième source d'émissions correspond aux industries utilisant des procédés engendrant des émissions de polluants atmosphériques comme les NO_x, le SO₂ et les composés volatiles organiques.

Les feux de forêt et la combustion de la biomasse sont des autres sources non négligeables puisqu'ils rejettent aussi des NO_x, du CO, des composés organiques volatiles et des particules en suspension. Ces événements sont toutefois imprévisibles et par conséquent difficilement quantifiables pour les recensements d'émissions polluantes.

Pour finir, la nature est source de différents gaz et particules, les plus connus étant les composés volatiles organiques émis par les arbres et autres végétaux (par exemple : terpène, isoprène et autres composants). L'élevage n'est pas à exclure non plus puisqu'il produit environ 9% des émissions anthropiques de CO₂ via l'expansion des pâturages et l'utilisation

d'énergie fossile pour le fonctionnement des engins agricoles ainsi que le chauffage des bâtiments (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2006).

2. Le moteur diesel pointé du doigt pour sa possible implication dans la toxicité environnementale

Durant les vingt dernières années, la taille du parc automobile des véhicules à essence a diminué régulièrement et progressivement tandis que celle du diesel a explosé entre 1995 et 2005 pour ralentir par la suite. (Figure 2). Actuellement, le pourcentage de véhicules particuliers à moteur diesel dans le parc automobile français atteint 58,3%, faisant de la France la 8^e nation européenne avec le plus grand nombre de véhicules diesel derrière l'Irlande, le Portugal, l'Italie, le Luxembourg, l'Autriche, la Suède et l'Espagne (Comité Constructeurs Français d'Automobiles 2017).

Breveté par Rudolf Diesel en 1892, le moteur diesel a été développé comme un moteur offrant plus d'efficacité énergétique que les moteurs à essence et plus robuste, ce qui explique ses avantages économiques. De plus, la motorisation diesel émet moins de CO₂ qu'un moteur à essence. Toutefois, les moteurs diesel dégagent plus de particules par kilomètre parcouru que les moteurs à essence (Figure 3).

2.1. Composition des gaz d'échappement de moteur diesel

Comme les polluants atmosphériques, les gaz d'échappement de moteur diesel sont un mélange complexe regroupant trois phases: une solide, une liquide et une gazeuse (Westerholm & Egeback 1994 ; Chan et al., 2007).

La phase solide est principalement constituée de particules carbonées primaires avec un noyau de carbone élémentaire, aussi appelé carbone suie, de 10 à 30 nm de diamètre (Liati & Eggenschwiler 2010 ; Bernard *et al.*, 2014). Ces particules peuvent s'agglomérer et former des agrégats d'un diamètre pouvant aller de 60 à 100 nm (Cheng *et al.*, 1984). La formation de ces particules durant la combustion est complexe et encore peu connue à ce jour. La création des particules serait due à la pyrolyse du carburant non brûlé et des huiles de

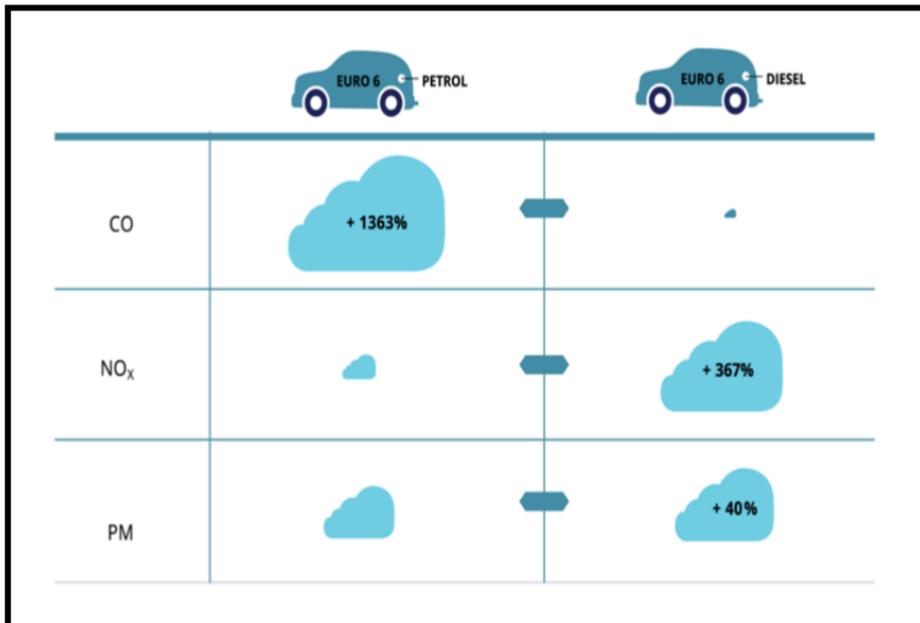


Figure 2 : Représentation graphique et comparaison des différents types d'émissions rejetées par les voitures essence et diesel (d'après l'Euro 6). Image issue de Bernal Melendez et al., a 2019.

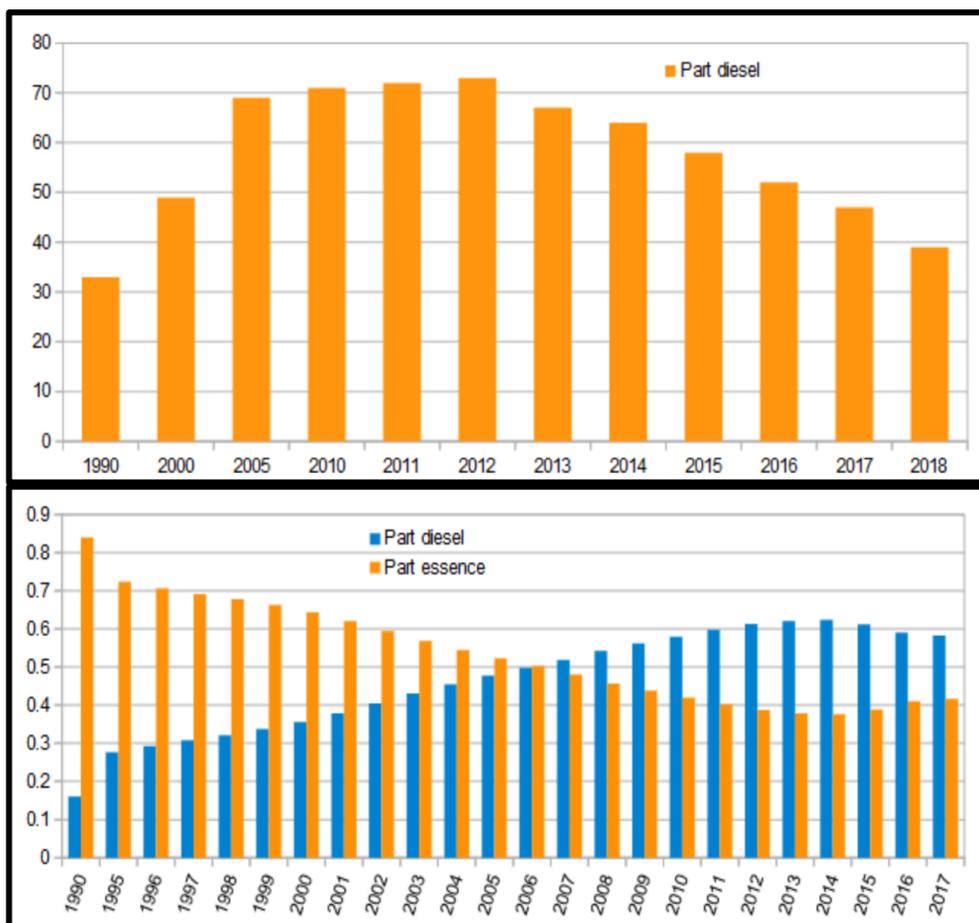


Figure 3 : En haut. Évolution des ventes de diesels sur les 26 dernières en France. Image issue de www.fiches-auto.fr. En bas. Représentation du parc automobile français concernant le rapport entre l'essence et le diesel depuis 1990. Il s'agit de la composition du parc automobile qui compte à ce jour 35 millions de véhicules. L'échelle de l'axe des Y est en pourcentage. Image issue de www.fiches-auto.fr.

lubrification, suivie de réactions de polymérisation et autres processus physico-chimiques (Steiner *et al.*, 2016 ; Figure 4). En plus du carbone élémentaire, la phase solide contient des métaux provenant des additifs des huiles de lubrification, du carburant ainsi que de l'usure du moteur (Mayer *et al.*, 2010). À la température de combustion, ces additifs peuvent subir des processus de nucléation, condensation ou vaporisation, conduisant à leur intégration dans les particules carbonées et la formation de particules avec un noyau métallique et/ou former des oxydes de métal avec un diamètre allant jusqu'à 10 nm (Burtscher 2005 ; Maricq 2007 ; Mayer *et al.*, 2010). D'autres phénomènes sont à prendre en considération lors de la formation des particules comme l'adsorption, la coagulation ou la condensation des composés organiques et soufrés qui s'associent à ces particules carbonées pour former des particules dites secondaires en raison de leurs modifications physico-chimiques.

La fraction organique liée aux particules diesel provient du carburant non brûlé, de l'huile de lubrification présente dans les moteurs et en faible quantité des produits de pyrolyse. Le carbone élémentaire reste le composant majeur de la phase solide (75%) (U.S.E.P.A. 2002). Il possède une faible capacité à se dissoudre dans les tissus biologiques comme la muqueuse pulmonaire, ce qui suppose que la composition chimique élémentaire de la particule joue un rôle dans la toxicité sans pour autant en être le facteur déterminant (Steiner *et al.*, 2012 ; Ma *et al.*, 2014). Néanmoins, les composés toxiques adsorbés à la surface des particules semblent produire des dérivés réactifs de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (Geller *et al.*, 2006 ; Antinolo *et al.*, 2015).

La phase gazeuse quant à elle, est composée à 99% de gaz inorganiques non toxiques comme l'oxygène, l'azote et l'eau. Le pourcentage restant correspond aux gaz toxiques tels que le dioxyde de carbone (CO₂), le CO, le monoxyde d'azote et le NO₂. La fraction organique est caractérisée par de petites molécules comme le méthanol, l'éthylène ou le formaldéhyde, mais surtout par des grosses molécules comme les HAP, les HAP nitrées et les composés aromatiques hétérocycliques (CAH). La présence de ces composés organiques sous forme gazeuse dépend de la température de l'échappement ainsi que du poids moléculaire du composé. De plus, ils peuvent être adsorbés par les particules carbonées ou métalliques ou se condenser pour former des particules qui formeront avec des gouttes d'eau la phase liquide des gaz d'échappement de moteur diesel (Zielinska *et al.*, 2004 ; Burtscher 2005).

Enfin, la composition de ces trois phases dépend essentiellement du type de moteur, du type de carburant, de l'huile de lubrification ainsi que de leurs additifs (Giakoumis *et al.*, 2013 ; Imtenan *et al.*, 2014 ; Popovicheva *et al.*, 2015). Pour la plupart de ces composés organiques, il est difficile de savoir s'ils appartiennent à la fraction gazeuse ou liquide, leur

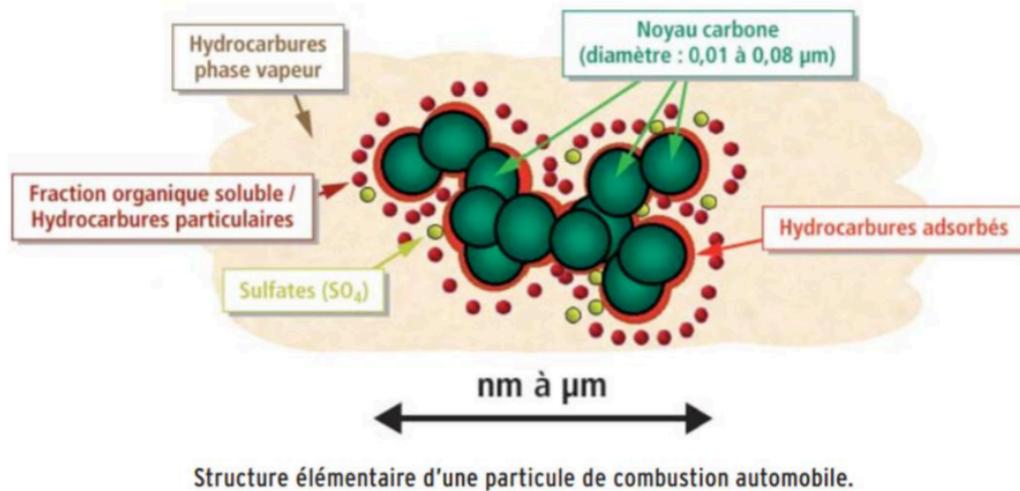


Figure 4 : **Composition chimique d'une particule de diesel.** Les particules Diesel se composent d'un carbone élémentaire engendré lors de la combustion, sur lequel sont adsorbées des espèces organiques diverses. Image issue de ADEME, 2005

attribution dépendant de l'équilibre entre la condensation et l'évaporation, la concentration d'échappement et la disponibilité des noyaux et des surfaces pour la condensation.

2.2. Les dangers en lien avec le diesel

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), qui est l'agence de l'OMS pour le cancer, a classé dans le groupe 1 les gaz d'échappement des moteurs diesel les considérant comme produit cancérigène "certain" pour l'Homme (Habert & Garnier, 2015 ; Santé Publique France, 2016).

Par ailleurs, pour la Commission Européenne, les émissions issues des moteurs diesel seraient responsables de 386 000 décès prématurés en Europe occidentale. De plus, ce ne sont pas tant les émissions de CO₂, mais plutôt celles de l'oxyde d'azote (NOx) et des particules fines et ultrafines qui sont pointées du doigt dans le cas des moteurs diesel. La toxicité des émissions des moteurs diesel semble ainsi essentiellement liée à leur phase particulaire et gazeuse. En effet, on estimait au sein de l'Europe en 2005 environ 30 000 décès précoces par an en lien avec la pollution atmosphérique urbaine (Conceição *et al.*, 2001). Hoek et collaborateurs (2002) ont également constaté une augmentation du nombre de décès au sein de populations habitant à proximité d'une route à trafic important. Enfin, l'OMS a estimé que la pollution de l'air en 2012 était responsable de 7 millions de décès dans le monde, dont près de 600 000 en Europe (ce qui correspond à un huitième du nombre total de décès (WHO, 2014a)).

La pollution de l'air favorise donc le développement de certaines pathologies chroniques graves. Les données épidémiologiques ont spécifiquement mis en évidence des effets de la pollution liée au trafic automobile sur les systèmes respiratoire et cardiovasculaire en particulier pour la phase particulaire (Pope *et al.*, 2004 ; Ostro *et al.*, 2006 ; Bai *et al.*, 2007). Le programme CAFE (Clean Air For Europe) de la Commission Européenne (CAFE, 2005) a calculé qu'en France 42.000 décès par an étaient en relation avec l'exposition chronique aux particules d'origine anthropique (notamment les particules fines, PM₁₀ et PM_{2.5}). Le projet Aphekom (2011), coordonné par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et mené dans 25 villes européennes de 12 pays, a rendu publique en mars 2011 une nouvelle évaluation des impacts sanitaires de la pollution atmosphérique en Europe. Cette étude a montré qu'une exposition chronique aux particules fines favorise l'apparition d'asthme chez l'adulte, de broncho-pneumopathies chroniques obstructives, d'altérations du développement de la fonction respiratoire chez l'enfant, de maladies cardiovasculaires et de cancers du poumon. À ce jour,

des preuves du rôle important des particules ultrafines à l'échelle nanométrique dans les effets observés s'accumulent (Ostro *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2015 ; Falcon-Rodriguez *et al.*, 2016 ; Xing *et al.*, 2016).

Récemment les données épidémiologiques ont également suggéré qu'une exposition à la pollution atmosphérique pouvait être à l'origine de troubles neurodégénératifs pouvant entraîner des pathologies graves dans des populations directement exposées, que ce soit chez l'enfant, l'adulte ou la personne âgée (Genc *et al.*, 2012 ; Costa *et al.*, 2014 ; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015).

Pour réduire l'impact des transports routiers sur la qualité de l'air, en complément de la diminution du trafic, les véhicules diesel ont ainsi été équipés de filtres à particules (Euro 6). Toutefois, et malgré cette mise en place, les filtres ne bloquent que les particules les plus massives. Les particules de petite taille ne sont donc pas retenues et continuent à être émises. Ces particules ultrafines constitueraient 90 % des particules émises par les moteurs diesel de dernière génération.

3. Les dispositifs mis en œuvre face à la pollution atmosphérique

3.1. Réglementations et recommandations

Des politiques publiques de réglementation ont été rapidement mises en place pour surveiller, informer et planifier des actions pour contrôler les niveaux de pollution atmosphérique. La première réglementation des émissions de gaz d'échappement a été mise en place en 1967 par l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA). En France, Air Parif, association agréée par le ministère de l'Environnement pour la surveillance de la qualité de l'air en région Ile de France, définit des « valeurs limites », des « seuils d'information, de recommandation et d'alerte » et des « objectifs de qualité » (AirParif 2010, 2016a ; Figure 5).

3.1.1. À l'échelle mondiale

L'OMS a publié en 2005 une synthèse présentant les effets de la pollution atmosphérique sur la santé en fonction des principaux polluants et les valeurs seuils au-delà desquelles la pollution atmosphérique est considérée comme nuisible à la santé (OMS 2005). Cette synthèse mentionne que la mortalité due à la pollution de l'air pourrait être réduite de

Polluants		Valeurs limites	Seuil de recommandation et d'information	Seuil d'alerte	Objectifs de qualité
Phase gazeuse	Dioxyde d'azote (NO ₂)	Moyenne annuelle (2010) : 40 µg/m ³ Moyenne horaire (2010) : 200 µg/m ³ (à ne pas dépasser plus de 18h/an)	Moyenne horaire : 200 µg/m ³	Moyenne horaire : 400 µg/m ³ (si dépassé sur 3h consécutives) 200 µg/m ³ (si dépassé la veille et risque le lendemain)	Moyenne annuelle : 40 µg/m ³
	Monoxyde de carbone (CO)	Maximum journalier de la moyenne sur 8 heures : 10000 µg/m ³			
Phase particulaire	PM ₁₀	Moyenne annuelle (2005) : 40 µg/m ³ Moyenne journalière (2005 et 2012) : 50 µg/m ³ (à ne pas dépasser plus de 35 jours/an)	Moyenne journalière : 50 µg/m ³	Moyenne journalière : 80 µg/m ³	Moyenne annuelle : 30 µg/m ³ (2005) et 25 µg/m ³ (2012)
	PM _{2,5}	Moyenne annuelle (2015) : 25 µg/m ³	Moyenne journalière : 30 µg/m ³	Moyenne journalière : 50 µg/m ³	Moyenne annuelle : 10 µg/m ³

Figure 5 : **Récapitulatif des valeurs limites, des seuils et des objectifs de qualité pour différents polluants atmosphériques en Europe.** **Valeur limite** : Niveau à ne pas dépasser et fixé sur la base des connaissances scientifiques menant à la prévention et la réduction des effets nocifs sur la santé humaine ou sur l'environnement ; **Seuil de recommandation** : Niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé humaine ; **Seuil d'alerte** : Niveau au-delà duquel une exposition de courte durée présente un risque pour la santé de humaine ou une dégradation de l'environnement ; **Objectif de qualité** : Niveau à atteindre à long terme et à maintenir afin d'assurer une protection efficace de la santé humaine et de l'environnement. D'après Air Paris, 2008 ; modifié par Valentino et al., 2017.

15% si la concentration atmosphérique en PM_{10} était réduite de 70 à $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Les valeurs seuils publiées par l'OMS pour la fraction particulaire sont de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle et $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne journalière pour les PM_{10} et de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne annuelle et $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en moyenne journalière pour les $PM_{2,5}$ (OMS 2005).

3.1.2. À l'échelle européenne et française

En Europe, les directives relatives à la qualité de l'air ont fixé successivement des niveaux maximaux de particules admissibles dans l'air ambiant de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} (directive 1999/30/CE) et $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les $PM_{2,5}$ (directive 2008/50/CE). Néanmoins, ces niveaux sont bien souvent dépassés. On estime que plus de 80% des Européens sont exposés à des niveaux de particules supérieurs à ceux préconisés par les lignes directrices sur la qualité de l'air émises par l'OMS (OMS, 2013).

Enfin, d'après l'avis de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) du 23 mars 2009, relatif aux particules dans l'air ambiant, l'impact sanitaire prépondérant à l'échelle française est dû à des expositions répétées à des niveaux modérés de particules. Ainsi, pour l'agglomération parisienne en 2004, l'impact sanitaire court terme causé par les particules fines était dû à 97% à des niveaux inférieurs à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les PM_{10} et 3% à des niveaux supérieurs à ce même seuil, du fait de la rareté de ces événements, d'après les données épidémiologiques du Programme de surveillance air et santé (Psas) et de l'Institut de veille sanitaire (InVS) (ANSES, 2009). Dès lors, il semble probable qu'il ne soit pas possible d'observer un seuil de concentration en particules en deçà duquel aucun effet sanitaire ne serait constaté. Considérant ces éléments, l'ANSES estime que l'abaissement de la valeur moyenne de la concentration particulaire sur le long terme amènerait à un bénéfice sanitaire plus important qu'une stratégie de gestion focalisée sur les pics journaliers de pollution particulaire. Autrement dit, d'un point de vue strictement sanitaire, la gestion des risques devrait prioritairement viser l'abaissement des niveaux moyens de particules. L'OMS conseille de ne pas dépasser $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ plus de 3 jours par an (ANSES, 2009).

3.2. Objectifs et actions contre les rejets polluants de l'air

Malgré la prise de conscience des dangers en lien avec la pollution atmosphérique et de ses conséquences pour l'environnement et la santé humaine, les capacités d'expertise, les moyens de recherche, la formation et l'information concernant l'évaluation des risques

chimiques tendent seulement à être coordonnés avec, pour l'instant, des résultats encore peu concluants (REACH, 2007).

Concernant la pollution de l'air, du fait de la contribution significative du trafic routier, des réglementations nationales et internationales visant les concentrations atmosphériques de polluants émises par les véhicules ont été mises en place aux États-Unis, dans l'Union Européenne et au Japon. Ces réglementations définissent en particulier la quantité (en g) de polluant émis (NO_x , CO, composés organiques volatiles et particules) par distance parcourue (en km) au cours d'un cycle de conduite standard (vitesse contrôlée). Il existe deux types de cycles de conduite. Les cycles modaux (comme le NEDC, New European Driving Cycle, utilisé en Europe) sont une compilation d'accélération linéaires et de périodes à vitesse constante (33 km/h).

Ils sont peu représentatifs de la réalité et c'est pourquoi le NECD a été remplacé en 2017 par le test WLTP (Worldwide harmonized Light vehicles Test Procedures), plus réaliste, mesurant les rejets de CO_2 et de certains polluants (NO_x , CO, hydrocarbures et particules fines). L'autre type de cycle de conduite correspond aux cycles transitoires. Ils comportent de multiples variations de vitesse et ressemblent davantage à des conditions de conduite sur route. Aux États-Unis, 5 cycles différents sont utilisés. Ils associent un cycle de représentation de la conduite en ville, un sur autoroute et trois autres simulant une conduite plus agressive, sous température extérieure élevée et sous température extérieure négative. Lors de ces cycles de conduite, les gaz d'échappement sont collectés puis analysés.

Si on note d'importants progrès en ce qui concerne les polluants classiques de l'air ambiant, notamment liés aux activités industrielles et au trafic, une attention particulière est affichée par rapport aux nanoparticules, pour lesquelles l'exposition et les effets sur la santé et le bien-être de l'individu sont encore mal connus (IFEN, 2006). En juillet 2017, l'ANSES dévoilait dans un avis, la nécessité d'accumuler de façon durable l'acquisition de données dans l'air ambiant pour les particules ultrafines et le carbone suie. De plus, il suggère d'assurer un suivi particulier sur le long terme pour ces deux substances, compte tenu de leur abondance et de leur enjeu potentiel en termes d'impact sanitaire.

Les objectifs actuels majeurs visent donc à la surveillance de la qualité de l'air et des rejets de polluants dans l'atmosphère, ainsi qu'à l'évaluation des effets sur la santé et l'information du public. Les directives établies reposent sur la réduction, la limitation, voire l'interdiction de certaines émissions polluantes dans une perspective de développement durable et d'amélioration de la qualité de l'air, permettant ainsi de minimiser l'impact de la pollution atmosphérique sur les différents écosystèmes et la santé des individus.

Au niveau européen, le plan « Air pur pour l'Europe », inscrit dans le programme « Clean Air For Europe (CAFE) », a pour objectif de mettre en place une stratégie intégrée et à long terme de lutte contre la pollution atmosphérique et de prévention des risques pour la santé et l'environnement en particulier en diminuant les risques d'exposition aux particules et à l'ozone.

Malgré les actions entreprises, les niveaux observés pour plusieurs polluants restent insatisfaisants notamment pour les particules, l'ozone et le dioxyde d'azote démontrant ainsi que ces réglementations ne sont pas toujours respectées. De ce fait, de nombreux travaux ont émergé dans le but d'identifier les effets néfastes de la pollution particulaire notamment ceux en lien avec l'évolution neurocomportementale de l'enfant. Afin de corroborer les constats épidémiologiques observés, le recours aux modèles animaux s'est avéré nécessaire pour analyser les mécanismes sous-jacents aux effets suite à une telle exposition, et ce, en contrôlant l'environnement maternel.

Partie II – Les méfaits et le questionnement légitime sur les particules issues du moteur diesel

1. Les divers effets nocifs des particules issues des fumées de diesel

La pollution atmosphérique, et plus particulièrement celle liée à la phase particulaire, est donc une préoccupation majeure en matière de santé publique et les données épidémiologiques récentes montrent qu'elle exerce des effets délétères sur l'organisme, que l'exposition survienne au cours de la vie adulte ou durant la période critique qu'est le développement foetal (Costa *et al.*, 2014 ; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2015). De taille nanométrique, elles peuvent pénétrer profondément dans le tractus pulmonaire et/ou franchir les barrières comme la barrière cutanée ou la barrière placentaire pour atteindre la voie systémique, et par extension de nombreux organes comme le foie, le rein, la rate ou le cerveau (L'azou *et al.*, 2008). Dès lors, la présence physique de ces particules au niveau de ces différents organes pose la question de leur toxicité à laquelle peu d'études ont été consacrées jusqu'à présent.

1.1. La contribution des particules fines aux neuropathologies

En 2001, Calderón-Garcidueñas et collaborateurs ont débuté leurs travaux en mettant en évidence un lien entre une exposition directe chronique à la pollution atmosphérique et une neurotoxicité. Ils ont étudié des chiens résidant dans des zones fortement polluées du Mexique et ont observé chez eux des dysfonctionnements neuronaux importants impliquant une rupture de la barrière hématoencéphalique (BHE) et une inflammation cérébrale. Ils ont aussi décelé une accumulation de plaques bêta-amyloïdes et une dégénérescence neurofibrillaire dans plusieurs régions cérébrales (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2001, 2003b, 2008a). Chez l'homme, cette équipe a mis en évidence l'accumulation de particules liées à la pollution automobile dans l'épithélium nasal chez des jeunes habitants de Mexico ainsi que la rupture de la barrière épithéliale des voies respiratoires. Des inflammations systémiques et cérébrales ont aussi été observées. Les particules semblent ainsi pouvoir transloquer facilement vers le système nerveux central et activer des réponses immunitaires, lesquelles peuvent contribuer à la mise en place des neuropathologies (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2003a, 2008a, 2008b, 2010, 2014).

Chez l'enfant, les données épidémiologiques montrent clairement une augmentation de la vulnérabilité à la pollution de l'air, et sa possible participation dans l'apparition de troubles neurodéveloppementaux, telles que les troubles du spectre autistique et les troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité (Guxens *et al.*, 2012, 2014 ; Becerra *et al.*, 2013 ; Lanphear *et al.*, 2015 ; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2016 ; Harris *et al.*, 2016). Cette vulnérabilité s'explique par le fait que le cerveau de l'enfant est en cours de développement. Celui-ci correspond à un phénomène complexe qui est caractérisé par une succession d'évènements cellulaires tels que la neurogenèse (prolifération des cellules neurales progénitrices), la migration de ces cellules vers les différents territoires cérébraux et la différenciation en neurones ou en cellules gliales.

Survient ensuite la synaptogenèse, phase pendant laquelle les neurones établissent les connexions synaptiques entre eux, la construction de ces réseaux neuronaux se faisant sous l'influence des stimuli environnementaux perçus par celui-ci. Pour autant, ces réseaux ne restent pas figés et sont modifiables tant au plan fonctionnel que structural tout au long de la vie de l'individu dans un phénomène dit de plasticité synaptique. Le développement cérébral s'établit, ainsi, selon une séquence temporelle précise qui débute lors des stades les plus précoces de la grossesse et qui se poursuit au cours des premières années de la vie postnatale, la persistance d'une plasticité fonctionnelle et /ou structurale des réseaux de neurones permettant ainsi d'adapter en permanence l'activité fonctionnelle cérébrale et le comportement aux stimulations provenant de l'environnement (Rice et Barone., 2000)

Du fait des caractéristiques de son développement, le cerveau est donc le seul organe qui reste sensible à des perturbations environnementales pendant une période relativement longue de la vie de l'individu, incluant l'ensemble de la gestation et la période prépubertaire avec de possibles conséquences au niveau neurocomportemental. Ces perturbations survenant au cours de la phase de développement précoce ont alors une influence néfaste sur la maturation cérébrale et peuvent altérer des processus histologiques et cytochimiques sans pour autant induire de lésions anatomiques décelables, mais, avec pour conséquence l'apparition de troubles fonctionnels qui peuvent être graves et qui peuvent nuire au devenir de l'individu. De telles approches relèvent du concept de la tératogenèse neurocomportementale ce qui fait du cerveau un organe hautement sensible aux PFD (Schroeder *et al.*, 2012).

Plusieurs revues, notamment celles de Guxens et Sunyer et de Block en 2012, récapitulent les études sur les effets neuropsychologiques de la pollution atmosphérique chez les enfants et adultes. Elles émettent l'hypothèse que la pollution de l'air engendrerait des lésions de la substance blanche et des vaisseaux cérébraux associées à des modifications

cognitives, comme des déficits cognitifs et des troubles du comportement chez l'enfant, l'adulte et les personnes âgées (Block *et al.*, 2012 ; Calderón- Garcidueñas *et al.*, 2010, 2014 ; Guxens et Sunyer., 2012). La nature des effets et leur intensité dépendraient alors des fenêtres et types d'expositions.

1.2. L'exposition précoce à la pollution de l'air due aux particules fines serait neurotoxique

Les premiers travaux épidémiologiques mettant en évidence un lien entre pollution atmosphérique et neurotoxicité développementale ont été réalisés par Frederica Perera et collaborateurs (Perera *et al.*, 2006, 2009, 2012). L'étude initiale a recruté plus de 600 femmes qui étaient à leur troisième trimestre de grossesse dans des localités environnant New York. Les femmes ont complété des questionnaires et ont reçu des moniteurs de pollution portables afin de permettre aux chercheurs de déterminer leurs taux d'exposition. Leurs enfants ont ensuite été examinés entre trois et sept ans.

Les résultats ont alors montré que l'exposition semblait être associée à divers problèmes cognitifs et comportementaux, y compris une réduction de la valeur du Quotient Intellectuel (QI) et des symptômes de déficit de l'attention, d'hyperactivité, d'anxiété et de dépression (Perera *et al.*, 2006, 2009, 2012). Quarante de ces enfants ont fait l'objet d'une exploration cérébrale par imagerie en résonance magnétique nucléaire, qui a révélé un lien entre l'exposition prénatale aux particules et une réduction de la surface de la matière blanche dans le cerveau (principalement sur toute la surface de l'hémisphère gauche), suggérant des altérations de la connectivité entre les différentes régions du cerveau (Peterson *et al.*, 2015). De plus, des perturbations neurocomportementales (déficits attentionnels et hyperactivité) ont été observées chez ces enfants. Pour terminer, les études de Volk et collaborateurs mettent en évidence le fait que les enfants californiens exposés pendant la grossesse à des niveaux élevés de polluants automobiles sont plus susceptibles de développer des troubles autistiques que les enfants plus faiblement exposés (Volk *et al.*, 2013).

Les récents travaux de Guxens et collaborateurs ont étudié le lien possible entre l'exposition aux particules fines au cours de la vie fœtale et d'éventuelles modifications morphologiques du cerveau et des fonctions cognitives. Ils ont observé 783 enfants nés entre 2002 et 2006, en monitorant l'exposition des mères résidant à Rotterdam (Pays-Bas) pendant toute la grossesse et sa relation aux déficits cognitifs de leurs enfants (Guxens *et al.*, 2018). Les enfants de 6 à 10 ans ont fait l'objet d'une exploration cérébrale par imagerie par résonance magnétique, ainsi que des tests cognitifs issus de NEPSY-II. L'imagerie a révélé

un lien entre le niveau d'exposition prénatale aux particules et une réduction de la surface du cortex pariétal (précuneus) et de la région rostro-médiale du cortex frontal. Les résultats des tests cognitifs ont révélé des troubles des fonctions exécutives de type troubles de l'attention et de l'hyperactivité. À ce jour ces enfants, ont entre 13 et 17 ans et sont encore suivis pour évaluer ces troubles.

L'ensemble de ces travaux suggère que l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique affecte le développement du cerveau au stade fœtal et pourrait donc prédisposer l'individu à des maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives plus tard dans la vie (Heusinkveld *et al.*, 2016). Toutefois, les répercussions de l'exposition maternelle sur la maturation du cerveau dans la phase périnatale, une période critique de son développement, ainsi que ses effets sur l'évolution neurocomportementale, restent peu connues. Compte tenu des niveaux d'exposition et de la multitude d'effets systémiques influant sur les pathologies du système nerveux central (SNC), il est difficile de dire quelle voie est empruntée par les particules et comment elles détériorent le développement du cerveau (Heusinkveld *et al.*, 2016).

Effectivement, lorsqu'on prend en considération la toxicité d'une substance chez le jeune individu, il faut tenir compte d'un grand nombre de facteurs, dont le stade de développement pendant lequel l'exposition a lieu.

Par ailleurs, les effets produits par un agent neurotoxique dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels la période, la durée d'exposition et les doses, mais aussi la possibilité d'activation métabolique d'intermédiaires réactifs, la distribution de la molécule ou de ses métabolites au sein du compartiment cérébral, la quantité présente effectivement dans le cerveau et sa capacité à interférer avec les processus de développement (Rice & Barone., 2000; Mendola *et al.*, 2002). Dès lors, les conséquences neurodéveloppementales d'une exposition précoce à un agent neurotoxique peuvent fortement varier (Mendola *et al.*, 2002).

2. Les découvertes issues des études expérimentales sur l'animal

Les études expérimentales sur les effets des polluants atmosphériques et des PFD sont essentielles, car elles permettent de faire des tests dans des conditions contrôlées. Ainsi le type et niveau d'exposition peuvent être définis tout comme l'environnement, ce qui évite des facteurs de confusion pouvant exister lors d'études chez l'humain. Aussi, elles permettent d'en apprendre davantage sur les mécanismes mis en jeu et de travailler sur des fenêtres d'exposition plus précises.

2.1. Des atteintes neurocomportementales chez la progéniture

Les études menées sur des modèles animaux d'exposition postnatale chronique et contrôlée à des particules de diesel récapitulent les effets indésirables sur le SNC observés dans les études épidémiologiques. La durée de l'exposition semble être un facteur primordial, comme le montrent les travaux de Fonken et collaborateurs (2011) selon lesquels une exposition postnatale de PM_{2.5} sur 10 mois est nécessaire pour causer des altérations de l'apprentissage spatial et de mémoire, ainsi que la genèse de comportements dépressifs chez la souris (Figure 6). Cependant, peu d'études ont mesuré l'évolution des atteintes au cours du temps, pour permettre de relier les effets précoces aux conséquences neurodégénératives à des stades tardifs.

Les données expérimentales sur les effets d'une exposition réduite à la phase prénatale, quant à elles, ont montré des altérations structurales et moléculaires des tissus neuronaux, pouvant conduire à des troubles neurocomportementaux chez l'adulte (Klocke *et al.*, 2017 ; revues Hougaard *et al.*, 2015 , Wong *et al.*, 2015). La plupart ont été conduites avec des expositions environnementales chroniques journalières de l'ordre de 50-100 µg/m³ pendant 6-8h/jour. Chez la souris adulte, les études réalisées par Yokota et collaborateurs (2009, 2013, 2016) ont démontré que l'exposition prénatale chronique aux particules issues des fumées de diesel (PFD) à faible concentration dans l'environnement (100 µg/m³) provoque des déficits de coordination motrice et des comportements impulsifs, liés à des perturbations de la neurotransmission monoaminergique dans des régions spécifiques du cerveau. L'exposition prénatale aux UFPM semble également altérer la différenciation *in vitro* des neurones corticaux prélevés à la naissance et provoquer un comportement semblable à la dépression chez la souris mâle adulte (Davis *et al.*, 2013).

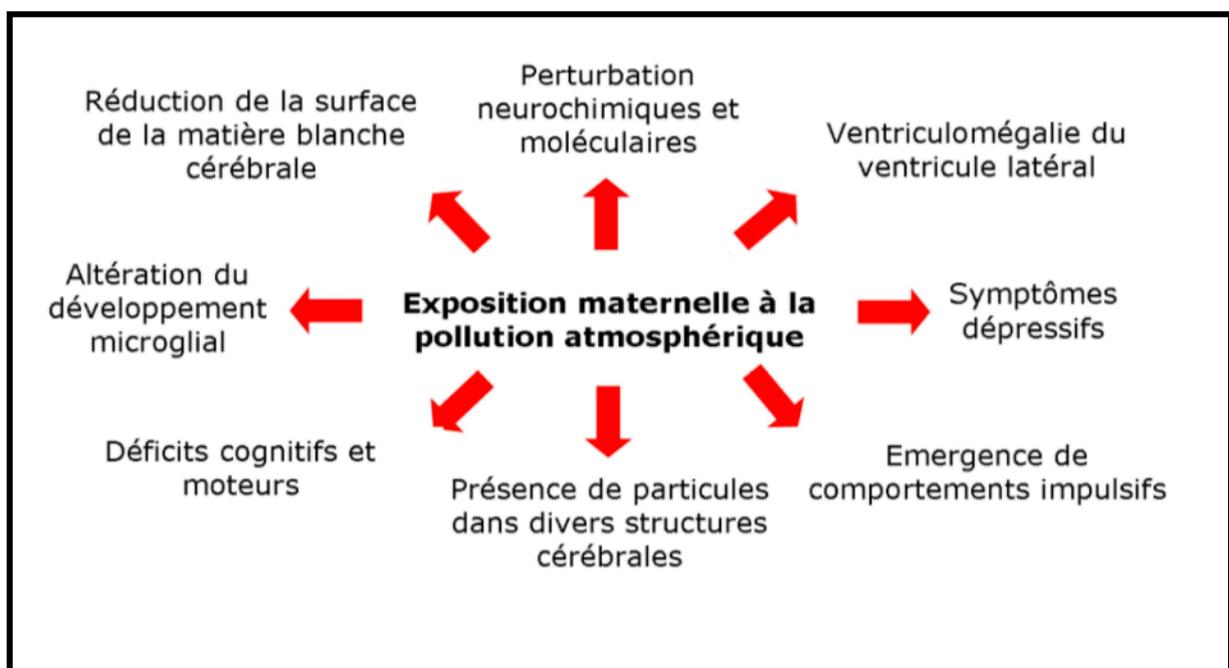


Figure 6 : **Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD chez l'animal.** Les études menées chez l'animal récapitulent les effets indésirables sur le SNC observés dans les études épidémiologiques. Image, issue de Bernal Melendez et al.,2019b.

Toutefois, certaines incohérences persistent concernant la nature du lien entre l'inhalation de particules et les neuropathologies associées. En effet, une étude réalisée par Suzuki et collaborateurs (2010) dans des conditions d'exposition environnementale comparables ($171 \mu\text{g DEP}/\text{m}^3$) a révélé une augmentation du niveau de dopamine et la noradrénaline ainsi que de leurs métabolites dans le cortex préfrontal dans le groupe exposé par rapport au groupe témoin. Ces données sont contradictoires à celles obtenues par Yokota et collaborateurs (2009). En revanche, dans ces deux études, l'indice d'activité neuronale de la dopamine est diminué dans diverses régions du SNC, y compris dans le striatum, et s'accompagne d'une diminution de la locomotion chez les animaux exposés.

D'autre part, il existe des controverses sur les effets affectant la fonction cognitive au cours de la vie fœtale. Une étude sur des souris exposées aux PFD *in utero* a mis en évidence des déficits dans le test de piscine de Morris, mais aucune différence dans le test d'apprentissage par évitement passif (Yokota *et al.*, 2015), alors que d'autres études n'ont révélé aucun effet sur les tâches d'apprentissage et de mémoire (Hougaard *et al.*, 2008, 2015).

Enfin, il a été montré que les souris mâles semblent être plus sensibles à des altérations du SNC suite à l'exposition aux particules. Les fœtus mâles exposés *in utero* aux PFD et à un stress maternel en fin de gestation présentent des altérations cognitives plus marquées que les femelles à l'âge adulte (Bolton *et al.*, 2013), comme observé par Davis et collaborateurs (Davis *et al.*, 2013), et confirmant les autres travaux sur une exposition précoce aux particules (Allen *et al.*, 2014a). Par ailleurs, une récente étude de Bolton et collaborateurs (2017) a montré que l'exposition aux PFD augmente la production de cytokines et modifie la morphologie de la microglie uniquement dans le cerveau des fœtus de souris mâles. Cette étude a également montré l'augmentation du volume cortical chez les mâles exposés, phénomène qui s'est traduit par une diminution dudit volume cortical à l'âge adulte. Cette observation peut être rapprochée des cas des troubles du spectre autistique, qui sont presque cinq fois plus fréquents chez les garçons que chez les filles (Baio, 2014). Les raisons avancées pourraient être liées à un neurodéveloppement différentiel des mâles et femelles. Il est à noter un biais dans la plupart des études anciennes de neurotoxicologie, les femelles étant souvent exclues des études comportementales.

2.2. Des observations à prendre avec beaucoup de précautions

2.2.1. Des conditions d'exposition multiples qui ne permettent pas de réelles comparaisons

Comme démontré auparavant, les multiples modèles d'exposition contrôlée confirment les résultats obtenus dans les travaux épidémiologiques. Cependant, les résultats obtenus dépendent de la nature du polluant étudié. Dans le cas d'une exposition aux PFD, les caractéristiques exactes des gaz d'échappement produits par le moteur diesel sont déterminantes. Aussi, le type d'exposition, les doses utilisées, les fenêtres et la fréquence d'exposition ainsi que les perspectives de l'étude sont à prendre en considération.

De ce fait, les conditions d'exposition orienteront les objectifs de recherche. Les méthodes dites « invasives » par exemple sont utilisées pour étudier en détail les mécanismes d'absorption et de dégradation des particules et/ou contrôler davantage les divers paramètres d'exposition (quantité de particules inhalées, par exemple). Dans les modèles rongeurs, les instillations intranasale ou intratrachéale permettent de contrôler la quantité de particules atteignant les poumons (Kyjovska *et al.*, 2015 ; Yoshizaki *et al.*, 2015). Ceci n'est pas représentatif des conditions rencontrées dans le cadre d'expositions environnementales naturelles.

2.2.2. Le choix du modèle animal déterminant pour l'interprétation des résultats

Comme dans toute recherche scientifique, les spécificités de la physiologie du modèle animal sont à prendre en compte pour pouvoir transposer des effets d'une exposition gestationnelle aux particules fines chez l'homme. Le SNC de chaque espèce présente de nombreuses caractéristiques notamment en ce qui concerne la vitesse de son développement, sa vulnérabilité et ses systèmes de protection (Stewart & Kalueff., 2015) . De nos jours, peu d'articles traitant de la question spécifique des interactions cerveau-nanoparticules, mettent en place une expérimentation appropriée qui donne des conclusions transposables à l'homme. Afin de s'approcher de la situation humaine, il pourrait donc être approprié d'utiliser des modèles animaux plus grands qui reproduiraient d'avantage les structures cérébrales humaines notamment en ce qui concerne le contenu en matière blanche.

Des études sur le développement cérébral périnatal et postnatal ont déjà été réalisées chez des moutons, lapins ou encore des porcs. Toutefois, les caractérisations anatomiques, comportementales et biochimiques restent limitées (Duhaime., 2006 ; Finnie., 2012).

On sait également que des différences morphologiques et physiologiques, comme les différences anatomofonctionnelles placentaires nécessitent une attention particulière lors de l'évaluation des effets potentiels des particules sur le SNC en développement. Il existe une large diversité de morphologies placentaires selon les espèces animales. Les variations de la morphologie placentaire visent à augmenter la surface d'échange entre le sang maternel et fœtal. Le nombre de couches cellulaires séparant le trophoblaste du sang maternel varie selon que l'on s'adresse à une souris, une lapine, une ruminante ou une femme (Hougaard *et al.*, 2015). Plusieurs espèces modèles, comme le lapin et le cobaye possèdent un placenta hémodichorial, où le sang maternel est directement en contact avec le tissu trophoblastique fœtal. Ces caractéristiques anatomofonctionnelles placentaires sont similaires à celles de la femme (Fischer *et al.*, 2012 ; Carter *et al.*, 2007), ils constituent donc des modèles animaux de choix pour les études sur les échanges foeto-placentaires.

Cependant quelques différences morphologiques placentaires font de l'homme une espèce unique. Par exemple son placenta est de type discoïde alors que celui du lapin est bidiscoïde. Une autre différence entre l'Homme et le modèle animal est l'architecture des membranes chorioniques (celles qui sont au contact du tissu utérin). Chez l'Homme, il s'agit de villosités chorioniques alors que chez les rongeurs et lapins, le placenta est de type labyrinthique, c'est-à-dire que les villosités chorioniques sont fusionnées de façon à entourer les lacunes sanguines maternelles.

Ces notions martèlent le fait que le choix du modèle animal est déterminant dans les études toxicologiques et qu'il conditionnera les paramètres d'une étude et les conclusions qui en découleront.

Partie III – L'individu en développement : une population à risque

Durant ces dernières années, l'ensemble des pathologies touchant les enfants a considérablement changé. En effet, dans la majorité des pays industrialisés, les infections infantiles classiques (variole, rougeole, diphtérie, poliomyélite, tétanos, choléra) ont été contrôlées, du fait d'une meilleure hygiène et à des progrès dans le domaine de la vaccination. Cependant, le 21^e siècle a vu l'apparition d'un grand nombre de maladies chroniques (asthme, cancers, perturbations endocriniennes, troubles neurodéveloppementaux et neurocomportementaux), dont l'étiologie est associée à la combinaison entre des facteurs de prédisposition génétique et l'exposition à certains agents environnementaux pendant le développement (Suk *et al.*, 2003).

Les enfants d'aujourd'hui sont confrontés à de nouvelles substances environnementales, et donc à de nouveaux risques pour leur santé. Il semble désormais évident que la plupart des pathologies qui visent actuellement les enfants sont causées ou aggravées par les substances chimiques présentes dans notre environnement (Landrigan *et al.*, 2004).

1. Sensibilité particulière de l'organisme au stade fœtal

Jusqu'à récemment, l'évaluation des risques liés à une exposition à des substances environnementales était essentiellement focalisée sur la nature et le niveau des expositions chez l'adulte, et sur les effets toxiques également caractérisés chez celui-ci. La période de développement fœtal ou la petite enfance était peu considérée (Landrigan *et al.*, 2004).

Cependant, depuis une trentaine d'années, les pédiatres et les toxicologues s'accordent à dire que l'enfant constitue un groupe à part entier au sein de la population, présentant à la fois une exposition particulière face aux substances qui l'entourent, et une sensibilité unique face à certains agents chimiques, physiques, ou biologiques (Landrigan *et al.*, 2004 ; Landrigan & Goldman., 2011).

La sensibilité accrue de l'organisme en développement, et plus particulièrement du système nerveux par rapport à un organisme mature est la résultante de divers facteurs. Durant le développement, l'exposition à des composés toxiques peut avoir des effets plus délétères sur l'organisme comparé à l'âge adulte. Le fœtus et le nouveau-né, exclusivement nourris par l'organisme maternel au cours de la grossesse et de l'allaitement, sont

indirectement exposés par leur mère, elle-même contaminée par la chaîne alimentaire et par la pollution atmosphérique. Elle devient donc vectrice de l'intoxication vis-à-vis de l'enfant.

À cela s'ajoute le fait que les organes en développement sont plus sensibles par leur immaturité (Dencker et Eriksson., 1998 ; Andersen *et al.*, 2000 ; Perera *et al.*, 2004), une intoxication prénatale peut affecter de manière critique le système immunitaire, le métabolisme et les fonctions neurologiques et avoir des conséquences pouvant persister tout au long de la vie de l'individu (Barker., 2004).

De plus, l'immaturité du métabolisme de l'organisme en développement conduit à de faibles capacités de détoxification (Grandjean & Landrigan., 2006), et le rend ainsi plus vulnérable à certains agents chimiques par rapport à un organisme adulte. Par exemple, le fœtus dépend essentiellement des capacités de métabolisation de sa mère. Cela s'explique par le fait que les enzymes de phase I (cytochrome P450) et de phase II sont peu actives (Reed & Besunder., 1989), bien que présentes dans son organisme (Dorman *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas, les enzymes du métabolisme des xénobiotiques commencent à se développer à partir du milieu de la grossesse, pour atteindre les niveaux de l'organisme adulte à environ 6 mois (Sly & Flack., 2008). Toutefois, certaines enzymes impliquées dans le contrôle du stress oxydant ne sont exprimées à des niveaux comparables à ceux de l'adulte que vers l'âge de 1 ou 2 ans, ce qui rend le jeune enfant particulièrement sensible au stress oxydant (Sly & Flack., 2008). L'immaturité des systèmes enzymatiques de détoxification augmente donc la quantité de xénobiotiques parents présents dans l'organisme, et leur durée de présence. Cela peut représenter un risque de toxicité important pour l'organisme en développement, sauf dans le cas particulier où les métabolites sont plus toxiques que les molécules mères (Sly & Flack., 2008).

Pour finir, le fœtus a une espérance de vie longue, ce qui laisse de nombreuses années pendant lesquelles les conséquences d'une exposition précoce à des agents toxiques peuvent être observées (Suk *et al.*, 2003 ; Sly & Flack., 2008). Ainsi, dans le cas d'une toxicité pour le système nerveux, un agent peut provoquer des dommages dits « silencieux » pour le cerveau en développement. Ils ne seront alors visibles que tardivement, quand le cerveau sera mature (Olney., 2002).

Dans le cas d'une exposition à la pollution atmosphérique, il est donc envisageable que les particules issues des fumées de diesel atteignent le fœtus et créent ce type de dommages chez un individu adulte. Il est donc important d'évaluer à long terme les répercussions de celles-ci.

2. Le transfert des particules entre la mère et le fœtus

En extrapolant les travaux sur le tabagisme maternel, un des facteurs environnementaux de type particulaire connu pour modifier le développement fœtal (Kim *et al.*, 2018), et sur la base des caractéristiques des PFD exposées auparavant, on peut émettre l'hypothèse que les PFD se comportent sensiblement comme les particules issues du tabagisme. Les nanoparticules sont capables de traverser le placenta via la circulation maternelle et atteindre le cerveau par voie systémique. Elles pourraient également se concentrer dans le liquide amniotique, ce qui permettrait aux PFD d'interagir avec les voies respiratoires du fœtus, et par conséquent d'atteindre le cerveau via la voie olfactive (Luck *et al.*, 1985 ; Kim *et al.*, 2018). Dès le cinquième mois de grossesse chez la femme, les narines du fœtus s'ouvrent et le système olfactif devient fonctionnel dès le dernier trimestre de gestation chez la plupart des mammifères, l'essentiel des systèmes neuromodulateurs étant déjà en place (Samat *et al.*, 2017).

Dès lors, les PFD pourraient interagir sur le développement des tissus neuronaux du fœtus par ces deux voies. Dans cette configuration, il est possible que des mécanismes directs et indirects des PFD puissent agir ensemble de manière additive, voire synergique.

2.1. Les particules inhalées peuvent atteindre le cerveau fœtal via les voies olfactives et systémiques

Lors de leur dépôt dans les voies respiratoires supérieures, une grande partie des particules semble être éliminée par voie mucociliaire, y compris au niveau du compartiment olfactif. Toutefois, ce système est peu efficace sur les plus petites particules (PM_{2.5}) et inutile pour les particules ultrafines, qui peuvent donc pénétrer sans problème au sein des alvéoles pulmonaires. La détoxification passe alors sous contrôle du système immunitaire, notamment via les macrophages logeant dans la région alvéolaire. Ceux-ci peuvent réagir rapidement, mais doivent désassembler les particules de poussière et les transporter via la circulation. Par conséquent, ce phénomène s'accompagne toujours d'une réaction inflammatoire plus ou moins importante.

De multiples travaux sur la biodistribution de nanomatériaux manufacturés montrent qu'une fraction des particules inhalées qui se déposent dans les voies respiratoires peut se déplacer à travers les barrières épithéliales qu'elles soient pulmonaires, gastro-intestinales ou dermiques, afin de gagner la circulation et franchir la barrière hématoencéphalique vers le parenchyme cérébral et ses structures (Oberdorster *et al.*, 2009 ; Kreyling., 2016 ; Bencsik *et*

al., 2018). Récemment, un transfert de nanoparticules par les neurones olfactifs au niveau cérébral a été également démontré (Bencsik *et al.*, 2018 ; Ibanez *et al.*, 2014 ; Kinoshita *et al.*, 2008). Le taux et l'importance de la translocation par chacune des voies dépendent d'un certain nombre de facteurs, notamment la taille des particules et leur agrégation (leur petite taille favorise leur translocation) ainsi que leurs propriétés de surface (par exemple, charge, les revêtements de protéines, de lipides, etc.). Les effets induits par la suite dans les divers organes atteints par les particules peuvent ainsi être dus soit à un effet direct (physique) des particules retenues sur ces sites, soit à un effet indirect lié, par exemple, à des processus d'inflammation induits par les particules, et pouvant ainsi contribuer à l'atteinte neuronale ou tissulaire (Heusinkveld *et al.*, 2016).

2.2. Le passage de la barrière hématoencéphalique fœtale

La barrière hématoencéphalique constitue une barrière biologique de protection étroite qui sépare la circulation sanguine dans le cerveau de la circulation systémique grâce à des jonctions serrées et adhérentes régulant la communication entre les péricytes et les astrocytes des vaisseaux (Alvarez *et al.*, 2013 ; Campos-Bedolla *et al.*, 2014 ; Banks., 2015). Par rapport à d'autres barrières biologiques, la BHE est particulièrement étanche, ce qui diminue le risque d'exposition à des menaces systémiques telles que les produits chimiques et les agents pathogènes. Malgré cette propriété, il a été mis en évidence que les particules véhiculées par le sang peuvent migrer au travers de cette barrière et que l'exposition à certaines particules peut augmenter la perméabilité de cette dernière (Sharma *et al.*, 2009).

Spécifiquement, l'un des paramètres pouvant déclencher le mouvement d'une particule vers le parenchyme cérébral est la charge de surface des particules. Elle va octroyer des propriétés physico-chimiques particulières, favorisant la formation d'une couronne de protéine autour de la particule au contact des fluides biologiques. Cette transformation entraîne sa captation rapide par le système phagocytaire et semble modifier son passage à travers les barrières biologiques et son interaction avec les différents tissus (Ali *et al.*, 2015 ; Docter *et al.*, 2015 ; Ruiz *et al.*, 2015).

Ainsi, le transport des particules à travers la BHE peut constituer une menace pour le cerveau. Ces dernières, par le biais de leurs modifications de surface, peuvent agir comme vecteurs de composants toxiques dans le parenchyme cérébral et pouvant provoquer l'activation des cellules gliales ainsi qu'une inflammation et un stress oxydatif (Sharma *et al.*, 2009).

3. Les dommages causés par les particules peuvent bouleverser le fonctionnement neuronal du fœtus

Des récents travaux ont démontré les effets délétères des particules sur différentes populations cellulaires et suggèrent leur implication dans la neurodégénérescence. D'après Calderón et collaborateurs, l'exposition humaine à la pollution atmosphérique engendre des dommages au niveau des cellules endothéliales du système vasculaire cérébral (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008, 2014). D'autres études *in vitro* utilisant des capillaires cérébraux entiers de rats exposés révèlent que l'exposition aux particules mène à la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactif Oxygen Species) (Hartz *et al.*, 2008 et Figure 7). Ainsi, les capillaires cérébraux répondent en régulant les fonctions physico-chimiques de la BHE et en produisant des signaux pro-inflammatoires, pouvant endommager les neurones environnants. Ces événements représentent une voie commune pour la neurodégénérescence induite par la voie microgliale (Block et Hong., 2005).

Enfin, il faut noter qu'une inflammation périphérique peut entraîner la libération de signaux pro-inflammatoires dans la circulation systémique (cytokines, par exemple) qui peuvent ensuite activer la microglie au niveau du cerveau et modifier le fonctionnement neuronal (Block *et al.*, 2013). Dès lors, la présence physique des particules dans le cerveau n'est pas systématique pour provoquer des altérations neuronales. Étant donné que le stade prénatal se caractérise par une interaction inflammatoire entre la mère et le fœtus en développement, et qu'à ce stade la BHE n'est pas encore totalement fonctionnelle, une question est de savoir si et comment la réponse inflammatoire maternelle peut influencer le développement fœtal.

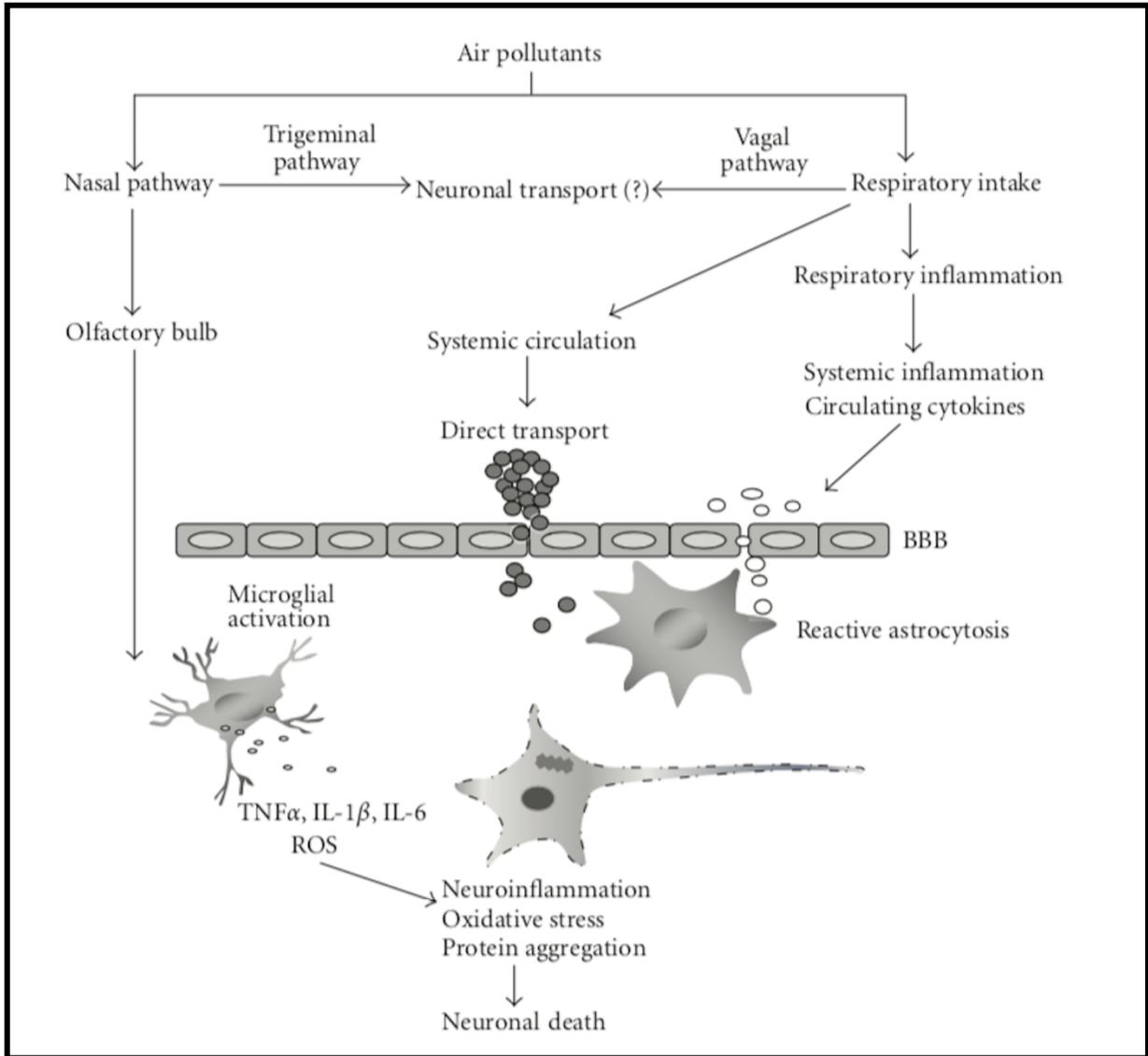


Figure 7 : Impact de la pollution atmosphérique sur le cerveau à travers différentes voies d'exposition. D'après Genc et al., 2012.

4. La politique mise en place pour protéger l'individu en développement

Pour certains auteurs, la protection des enfants face aux substances chimiques présentes dans l'environnement représente un enjeu majeur dans notre société moderne. L'individu en développement n'est pas seulement un groupe sensible au sein de la population, puisque ces périodes de développement sont un passage obligatoire pour chaque individu. Il devient ainsi absolument essentiel de protéger l'organisme en développement (Landrigan *et al.*, 2004).

Au niveau international, des efforts communs ont été réalisés depuis les années 1990, notamment au sein de l'OMS et l'ONU, pour identifier les liens entre la santé de l'enfant et l'environnement et définir des actions visant à protéger l'organisme en développement.

Au niveau national, cette problématique est au cœur des trois plans nationaux santé environnement. Dans le PNSE1 (2004-2008), « protéger les populations sensibles (enfants et femmes enceintes) » et « prévenir les pathologies d'origine environnementale » font partie des objectifs majeurs. Dans la continuité du premier plan, le PNSE2 (2009-2013), visait entre autres à « protéger la santé et l'environnement des enfants » et dernièrement le PNSE3 (2015-2019) a pour but « de prévenir les risques neurotoxiques et les déficits du développement neurocomportemental liés à des polluants environnementaux ».

Ainsi, malgré le fait que la compréhension de la sensibilité particulière de l'organisme en développement face à certains agents environnementaux soit relativement récente, de nombreuses actions sont entreprises au niveau national et international pour améliorer les connaissances et les recherches, ainsi que la protection de l'individu lors des périodes très sensibles du développement. L'un des challenges actuels est de maîtriser l'exposition du jeune, notamment du fœtus, aux contaminants environnementaux, mais dont les effets peuvent rester silencieux pendant des décennies et émerger à un âge plus avancé (Walker., 2005).

C'est vers cette direction que des programmes tels qu'EPAPP et BrainAirPoll ont été mis en place. Le projet EPAPP (Effets de la Pollution Atmosphérique sur la fonction Placentaire et le développement Post-natal) a été un programme de recherche financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et par des fonds européens (FP7) qui a eu pour but d'évaluer les effets d'une exposition gestationnelle, aux gaz d'échappement de moteur diesel sur le développement embryonnaire, fœto-placentaire et post-natal ainsi que sur les

effets intergénérationnels chez le lapin. À ce projet initial, est venu s'ajouter un programme d'étude de la toxicité cérébrale de ce type d'exposition financé par l'ANSES et l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie), le programme BrainAirPoll.

Les principaux résultats du programme EPAPP ont démontré que l'exposition de lapines F0 pendant leur gestation à des gaz d'échappement de moteur diesel riches en PFD de taille nanométrique entraîne des signes d'hypotrophie fœtale à mi-gestation avec une réduction de la longueur de la tête et de la pulsativité ombilicale (Valentino *et al.*, 2016).

À trois jours du terme, les fœtus exposés présentent une réduction de la longueur de la tête et du périmètre abdominal par rapport au groupe contrôle (Valentino *et al.*, 2016).

De plus, les concentrations plasmatiques fœtales en insuline et Insulin-like growth factor-1(IGF-1), marqueurs de retard de croissance intra-utérin, sont réduites dans le groupe exposé. Cependant, la taille du cerveau n'a pas été affectée, ce qui suggère une protection importante de cet organe majeur pour l'organisme (Valentino *et al.*, 2016).

En ce qui concerne le programme BrainAirPoll, programme dans lequel ce travail de thèse fait partie, l'analyse histologique et ultrastructurale de la muqueuse et du bulbe olfactif de fœtus de la génération F1 a mis en évidence la présence de nanoparticules (20 à 40 nm de diamètre), des altérations de la cytoarchitecture ainsi qu'une hypertrophie cellulaire et axonale (Bernal Meléndez *et al.*, 2019). Ces modifications s'accompagnent de désordres de la neurotransmission observés au même stade dans le bulbe olfactif et certaines zones du cerveau qui affectent plus particulièrement les systèmes dopaminergiques et sérotoninergiques ainsi que d'altérations des capacités olfactives et cognitives à reconnaître la phéromone mammaire maternelle dès la naissance.

L'ensemble de ces résultats montre donc la capacité d'une exposition gestationnelle aux particules de fumées de diesel à atteindre le tissu olfactif qui est à l'interface entre le cerveau et l'environnement extérieur comme le liquide amniotique chez le fœtus et à modifier la fonctionnalité du système olfactif à court terme. Témoin de la continuité anatomofonctionnelle entre le système olfactif et le cerveau, des désordres fonctionnels ont été également observés dans certaines zones du cerveau et laissent donc à penser que la présence des particules au niveau olfactif est associée à des modifications au niveau central avec de possibles conséquences à long terme.

Objectif de thèse

En plus des effets néfastes au niveau respiratoire et cardiovasculaire (Falcon-Rodriguez *et al.*, 2016 ; Pope *et al.*, 2004 ; Ostro *et al.*, 2006 ; Xing *et al.*, 2016), les données épidémiologiques, ainsi que les études expérimentales et *in vitro*, suggèrent que les émissions de particules fines liées aux automobiles seraient à l'origine de troubles neurodégénératifs pouvant causer de lourdes pathologies dans des populations directement exposées (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008, 2010 ; Fonken *et al.*, 2011 ; González-Domínguez *et al.*, 2014).

Ces dernières années, divers travaux ont mis en évidence des dysfonctionnements olfactifs comme signes précurseurs observés avant l'apparition des symptômes cognitifs et moteurs liés à de nombreux troubles neurodégénératifs (Doty *et al.*, 2012 ; Rey *et al.*, 2018). Un transfert de polluants atmosphériques au niveau cérébral via la voie olfactive avec, pour conséquences, de possibles lésions tissulaires et des troubles neurocomportementaux, a aussi été montré (Ibanez *et al.*, 2014 ; Kinoshita *et al.*, 2008 ; Win-Shwe *et al.*, 2011), ainsi que des effets sur la sensibilité olfactive chez l'enfant (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2001, 2008 ; Peters *et al.*, 2006). Cependant, il y a peu d'éléments permettant d'effectuer un lien mécanistique ou de déceler une origine commune aux atteintes centrales et périphériques liées à la pollution atmosphérique.

Durant la dernière décennie, des études épidémiologiques ont montré un rôle possible d'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique dans l'apparition de troubles neurodéveloppementaux chez l'enfant, notamment des troubles du spectre autistique et des déficits de l'attention et d'hyperactivité, ainsi que d'autres troubles du comportement et de l'apprentissage (Becerra *et al.*, 2013 ; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2016 ; Guxens *et al.*, 2014, 2018 ; Harris *et al.*, 2016 ; Lanphear *et al.*, 2015). De plus, des études expérimentales ont montré que l'exposition gestationnelle aux polluants atmosphériques induit des altérations structurales et moléculaires dans les tissus cérébraux, pouvant conduire à des troubles neurocomportementaux postnataux (Allen *et al.*, 2014 ; Hougaard *et al.*, 2015 ; Wong *et al.*, 2015). Néanmoins, les effets d'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique sur le système nerveux, à une période critique de son développement anatomique et fonctionnel, restent contestés. De plus, la plupart des études réalisées sur des modèles animaux miment de manière imparfaite la réelle exposition (niveau et fréquence d'exposition, type de particules...) (Klocke *et al.*, 2017 ; Yokota *et al.*, 2009, 2013, 2016).

C'est pourquoi le projet BrainAirPoll a été mis en place. Il a pour objectifs d'étudier les répercussions de l'exposition quotidienne et répétée aux particules de fumées de diesel de lapines gestantes sur le développement cérébral de la descendance. Cette étude a été menée au niveau des voies du système olfactif qui constitue une interface de première importance entre le liquide amniotique et le système nerveux central ainsi qu'un axe de transfert direct de nombreuses molécules vers le tissu cérébral, et au niveau des régions supérieures du cerveau impliquées dans la régulation des fonctions comportementales et cognitives. L'étude de la plasticité des circuits périphériques liés à l'olfaction ainsi que des voies nerveuses supérieures permettra ainsi de caractériser les conséquences à court et à long terme sur le développement et la santé de l'individu, d'une exposition in utero aux particules de fumées de diesel.

Les lignes directrices du projet BrainAirPoll sont donc les suivantes :

- Évaluer le degré de toxicité pour les fœtus de l'exposition in utero aux particules de fumées de diesel en identifiant au stade fœtal les cibles cellulaires des voies neuronales affectées.
- Identifier les effets de l'exposition chronique aux particules pendant la gestation sur les mécanismes du développement cérébral et/ou la modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'organisation des réseaux neuronaux.
- Déterminer les conséquences à court et à long terme de cette exposition sur la plasticité et la fonctionnalité des centres cérébraux supérieurs impliqués dans la régulation des fonctions comportementales et cognitives.
- Caractériser l'impact de ce type de pollution sur le développement anatomique et fonctionnel du système olfactif qui est une fonction sensorielle qui se développe très tôt et qui est essentielle à la survie de l'animal. La fonction olfactive a été aussi choisie compte-tenu de sa localisation neuroanatomique à l'interface entre l'environnement et le cerveau et de son implication dans la régulation de la prise alimentaire et le développement des interactions sociales dès la naissance.

Mon travail s'inscrit donc dans ce vaste projet et plus particulièrement dans une problématique qui vise à analyser les répercussions d'une exposition gestationnelle aux fumées d'échappement de moteur diesel sur le développement neurocomportemental de la descendance à l'âge adulte, et d'évaluer les possibles effets de cette exposition. L'originalité de ce travail est de se concentrer sur différentes régions du cerveau, impliquées dans la régulation des fonctions comportementales et cognitives et de poursuivre dans la lignée des résultats obtenus chez le fœtus.

Matériels & Méthodes

1. Expérimentation animale

1.1. Procédure expérimentale d'exposition

Le programme de recherche ANR EPAPP (ANR-13-CESA-0011) a débuté en septembre 2013. À mon arrivée dans le projet, la phase expérimentale d'inhalation était terminée. Ainsi, mes principales sources concernant la procédure expérimentale d'exposition sont le rapport de thèse du Dr. Sarah Valentino, première doctorante du dit programme, ainsi que les comptes-rendus des réunions de consortium BrainAirPoll.

L'ensemble de ces travaux a été approuvé par le comité d'éthique local (N°45 dans le registre national français) sous le numéro 12/102. Les animaux ont été hébergés dans les locaux de l'UCEA (Unité Commune d'Expérimentation Animale) sur le site INRA de Jouy en Josas.

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées en conformité avec les normes éthiques définies par la directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et la réglementation française en matière d'expérimentation animale (décret 2013-118 et arrêtés du 1er février 2013).

1.2. Le choix du modèle expérimental

En Europe, le lapin (famille des lagomorphes) est le troisième modèle animal le plus utilisé dans les laboratoires (2,78%) après la souris (59,3%) et le rat (17,7%). Cet animal est habituellement choisi pour des tests toxicologiques (cosmétiques ou pharmacologiques) ou encore comme modèle biomédical pour des pathologies cardiovasculaires ou tumorales.

Dans le cadre du programme EPAPP et par extension BrainAirPoll, le lapin a été désigné pour les nombreux avantages physiologiques qu'il présente, en accord avec les objectifs principaux du projet. Tout d'abord son placenta est de type hémodichorial, ce qui correspond au modèle le plus proche du placenta humain contrairement aux modèles rongeurs (Fischer *et al.*, 2012 ; Furukawa *et al.*, 2014). Ensuite sa taille est adéquate pour réaliser un suivi échographique de la croissance fœto-placentaire, grâce aux mêmes outils échographiques que ceux utilisés en clinique humaine et en utilisant les mêmes paramètres que pour le fœtus humain. Sa période intergénérationnelle courte permet d'étudier les effets intergénérationnels d'une exposition gestationnelle. Enfin son métabolisme lipidique est

proche de celui de l'homme avec une majorité de lipoprotéines LDL circulantes. Chez les rongeurs ce sont les HDL qui sont majoritaires. De plus, le lapin possède des homologies de séquence avec l'homme et des outils de transcriptomique sont disponibles pour l'analyse haut-débit de l'expression génique dans nos tissus d'intérêt.

Toutefois, le lapin est un animal extrêmement sensible au stress, paramètre dont il a fallu tenir compte au cours de l'expérimentation animale. Aussi, la taille de la portée varie avec celle de l'homme. La lapine donne naissance à une portée de 7 à 12 fœtus alors que la femme n'a qu'un ou deux enfants par grossesse. Enfin, la gestation de la lapine (30-32 jours) est très courte, plus longue que celle des rongeurs, mais largement inférieure aux neuf mois de grossesse chez la femme.

1.3. Matériels et conditions d'exposition mis en place

Le matériel d'exposition utilisé a été apporté par l'équipe du Dr Flemming CASSEE du National Institute for Public Health and the Environment (RIVM).

Il s'agit d'un laboratoire mobile MAPCEL (Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory) connecté à un moteur diesel 25KVA de l'entreprise Loxam, moteur de référence de l'équipe du RIVM (Figure 8). Ce moteur a été équipé d'un filtre à particules permettant l'émission de particules possédant un diamètre inférieur à 500 nm. Le flux de gaz d'échappement de moteur diesel est réduit puis mélangé à de l'air purifié.

Au cours des deux mois d'expérimentation, la gestion des paramètres d'exposition et de mesure du MAPCEL a été assurée par les membres du RIVM, et a permis :

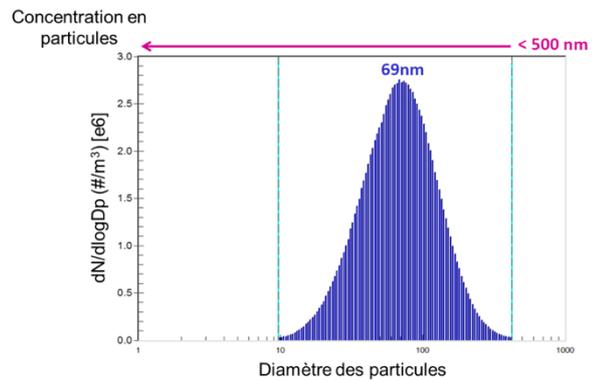
- Le contrôle de la concentration en particules à la valeur souhaitée (grâce à la maîtrise du flux d'air)
- La mesure de la concentration en gaz (NO_x, CO et CO₂)
- Le contrôle de la température (21-23°C) et de l'humidité relative (40-45%)

Il a été décidé que les animaux contrôles seraient exposés à de l'air extérieur filtré ; les animaux exposés seraient soumis à des gaz d'échappement de moteur diesel filtrés et dilués à une concentration en particules maintenue à 1 mg/m³, les particules présentant un diamètre inférieur à 500 nm. Suite au calcul de temps d'exposition nécessaire permettant de se rapprocher des conditions d'exposition journalière chez l'Homme, il a été décidé que les lapines seraient exposées deux heures par jour (une heure le matin et une heure l'après-midi), cinq jours par semaine. Cette gestion a permis d'obtenir une exposition au gaz dont la

concentration moyenne journalière en particules a été de $80 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et contenait majoritairement des nanoparticules avec un diamètre moyen de 69 nm, après métrologie. On remarque que, si la concentration moyenne quotidienne en particules est ici supérieure aux normes recommandées par l'OMS pour les $\text{PM}_{2.5}$ (qui s'élève à $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour le seuil de recommandation et à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ pour le seuil d'alerte), les particules présentes dans le mélange appartiennent majoritairement à la classe des particules ultrafines (UFPM), classe de particules insuffisamment étudiées pour être réglementée, et pour lesquelles, actuellement, aucune recommandation claire n'est établie (OMS, 2013).

Étant donné que les paramètres d'exposition établis devaient être contrôlés et maintenus tout au long de l'exposition, il a été décidé de réaliser une exposition à l'air pollué par inhalation stricte grâce à un dispositif « nose-only ». Cette méthode permet une exposition au niveau nasal seulement et non sur le corps (Van Berlo *et al.*, 2010).

Afin de mettre en place cette méthode par inhalation stricte chez le lapin, des tubes de contention en plexiglas ont été spécialement fabriqués.



Concentration moyenne en particules : **1014 ± 133**
µg/m³

Taille moyenne des particules : **70 ± 1 nm**

Température : **22 ± 1 °C**

Humidité : **45 ± 2 %**

Concentration moyenne des gaz

Monoxyde de carbone (CO) : **5,6 ± 0,4 ppm**

Monoxyde d'azote (NO) : **25,2 ± 3,8 ppm**

Dioxyde d'azote (NO₂) : **0,7 ± 0,5 ppm**

Oxydes d'azote (NO_x) : **25,9 ± 3,6 ppm**

Figure 8 : Dispositif MAPCEL et les différents paramètres (température, humidité, concentrations en polluants atmosphériques gazeux) qui ont été mesurés en continu au cours de l'exposition de manière à assurer la stabilité des conditions d'exposition au cours de cette période.

2. Démarche expérimentale

Afin de limiter des phénomènes liés à un stress pouvant nuire aux analyses anatomiques et comportementales, les lapines ont été habituées à la mise en contention et à la manipulation humaine, ainsi qu'aux bruits provoqués par le matériel d'exposition. La dernière semaine avant le début des expérimentations, les animaux ont été habitués à recevoir un flux d'air au niveau du museau, grâce à un petit module d'exposition.

Afin d'obtenir des groupes homogènes pour la suite du protocole expérimental, une sélection des lapines en fonction de leur degré d'habituement et leur poids a été réalisée. L'ensemble des lapines a été sailli par des mâles témoins issus de la lapinerie.

Pendant l'expérimentation, 16 gestantes ont été exposées du 3^e jour de gestation (GD3) au 27^e jour de gestation (GD27) à l'atmosphère polluée, décrite précédemment ; en parallèle, 14 lapines gestantes ont été exposées, dans les mêmes conditions, à une atmosphère non polluée (de l'air ambiant filtré) (Figure 9).

Les lapines F0 ont été réparties dans 4 séries :

- Une première série utilisée pour l'analyse du développement embryonnaire avec des collectes d'embryons à GD6.
- Une deuxième série suivie par échographie pendant la gestation et euthanasiée quelques jours avant le terme (à GD28) afin d'étudier la croissance fœto-placentaire des animaux dits de génération F1.
- Une troisième série a donné naissance à la génération F1, laquelle a été suivie de la puberté jusqu'à l'âge adulte.
- Enfin, une quatrième série (composée d'une partie des femelles F1) a été mise à la reproduction dans le but d'explorer le développement fœto-placentaire de la génération suivante, dite génération F2. Les lapines ont été euthanasiées à GD28, afin d'étudier la croissance fœto-placentaire des animaux F2.

Les animaux produits dans cette expérimentation ont été mutualisés par plusieurs équipes afin d'étudier les effets de la pollution indirecte dans différents tissus. Je ne décrirai, par la suite, que les études afférentes à mon projet de thèse, basé sur la troisième série d'animaux utilisée pour étudier l'impact de la pollution sur le développement du système nerveux central et périphérique de lapereaux et leur fonctionnalité à l'âge adulte.

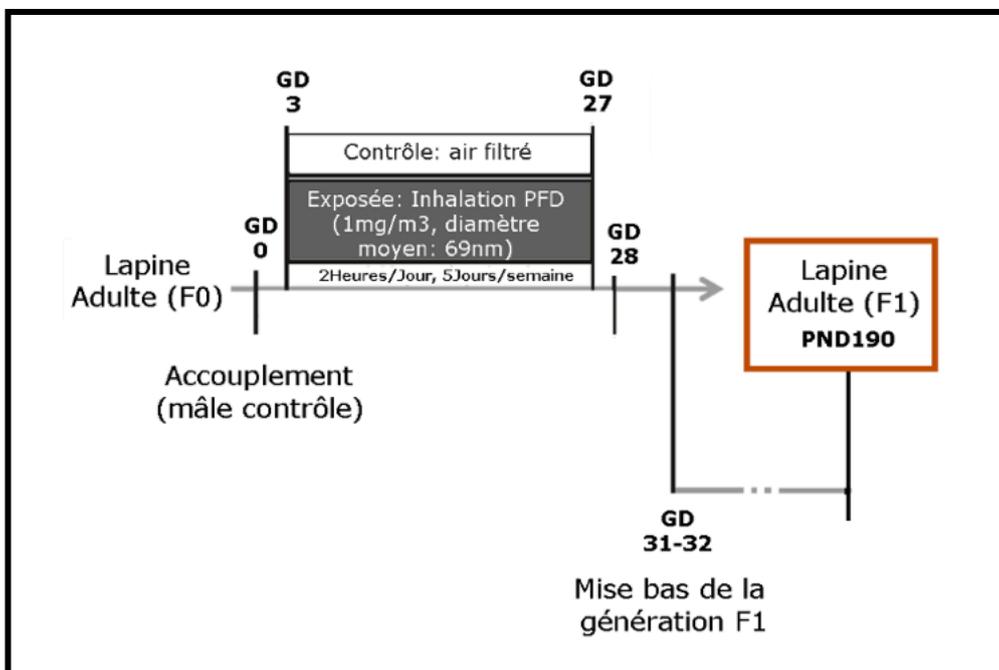


Figure 9 : Protocole d'exposition et temps des prélèvements des échantillons de tissu nerveux (Système olfactif et cerveau)

2.1. Exploration des fonctions cérébrales

2.1.1. Analyse histochimique de l'activité métabolique neuronale via la cytochrome oxydase

L'étude de possibles altérations neuronales a été envisagée *via* l'analyse histochimique de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, dont l'activité met en évidence la capacité énergétique des neurones ainsi que leur niveau d'activité.

2.1.2. Principe de l'analyse histochimique via la cytochrome oxydase

La cytochrome oxydase est une enzyme du complexe IV de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale, qui est fortement impliquée dans la synthèse d'ATP (Adénosine Triphosphate) dans les neurones. En effet, ces derniers fonctionnent en aérobie, contrairement aux cellules gliales qui peuvent utiliser des mécanismes énergétiques en anaérobie. Ainsi, on peut dire que l'activité neuronale dépend, avant tout, de la consommation du glucose et du métabolisme oxydatif, permettant l'apport d'énergie à la cellule et la réponse aux besoins énergétiques accrus lors de la stimulation des réseaux neuronaux.

Wong-Riley et collaborateurs (Wong-Riley *et al.*, 1989) avaient ainsi montré que l'activité de la cytochrome oxydase pouvait être considérée comme un indice valide et fiable de l'activité métabolique du neurone du fait que cette enzyme est synthétisée proportionnellement aux besoins énergétiques de la cellule.

J'ai utilisé une technique de marquage et de quantification de l'activité régionale de la cytochrome oxydase par histochimie développée dans notre laboratoire (version modifiée basée sur le protocole de Wong-Riley (Wong-Riley *et al.*, 1989)). Au sein du laboratoire, cette technique a déjà permis de mettre en évidence des variations localisées de l'activité cérébrale de la cytochrome oxydase chez des animaux exposés précocement à des contaminants chimiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Crépeaux *et al.*, 2012, 2013) ou l'HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD), un retardateur de flamme bromé (Olivier *et al.*, 2016).

2.1.3. Procédure de préparation

Les tissus cérébraux des adultes F1 (les hémisphères droits) ont été récupérés et congelés dans une solution de 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide, puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

Concernant les hémisphères des lapins adultes, nous avons décidé d'effectuer des blocs de coupe, permettant l'exploration de l'ensemble des territoires cérébraux depuis le tronc cérébral jusqu'au cortex préfrontal (Figure 10). Ainsi, des coupes sériées de 20 µm d'épaisseur dans le plan frontal ont été réalisées au cryostat (Bright OTF 5000, Allemagne) à -20°C, sur des lames préalablement gélatinées. Trois coupes adjacentes ont été déposées sur une même lame. 8 séries de lames ont été réalisées par bloc de cerveau et 48 coupes jetées entre chaque bloc. Chaque série a été utilisée pour la réalisation d'un marquage particulier (cytochrome oxydase et AChE notamment) (Figure 11). Toutes les coupes ont été stockées à -80°C jusqu'à la réalisation du marquage d'intérêt.

2.1.4. Marquage et analyse des tissus

La révélation de l'activité de la cytochrome oxydase est basée sur une réaction d'oxydoréduction. Lors de l'incubation, le substrat (cytochrome c) est oxydé par la cytochrome oxydase endogène présente sur les coupes tissulaires. Le cytochrome c oxydé est ensuite réduit, en transférant des électrons à la diaminobenzidine (DAB). Le DAB oxydé forme alors un précipité marron insoluble dont l'intensité est proportionnelle à l'activité de la cytochrome oxydase présente dans les tissus.

Tous les produits chimiques nécessaires à la technique de marquage ont été achetés auprès de Sigma- Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Les lames expérimentales ont été incubées en même temps que des lames dites « standard » (homogénats de cerveau de rat adulte d'épaisseurs variables et connues) à l'obscurité à 37°C pendant 90 minutes dans une solution de 0,04 g de cytochrome c extraite de cœur de cheval, 0,10 g de diaminobenzidine (DAB), 8 g de saccharose et 0,036 g de catalase dans 180 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4. La réaction a été arrêtée par rinçage de lames dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, avec 10% de saccharose (p/v) pendant 5 minutes. Le tissu a été fixé dans du formol tamponné (formaldéhyde à 4% (v/v)) à température ambiante pendant 30 minutes.

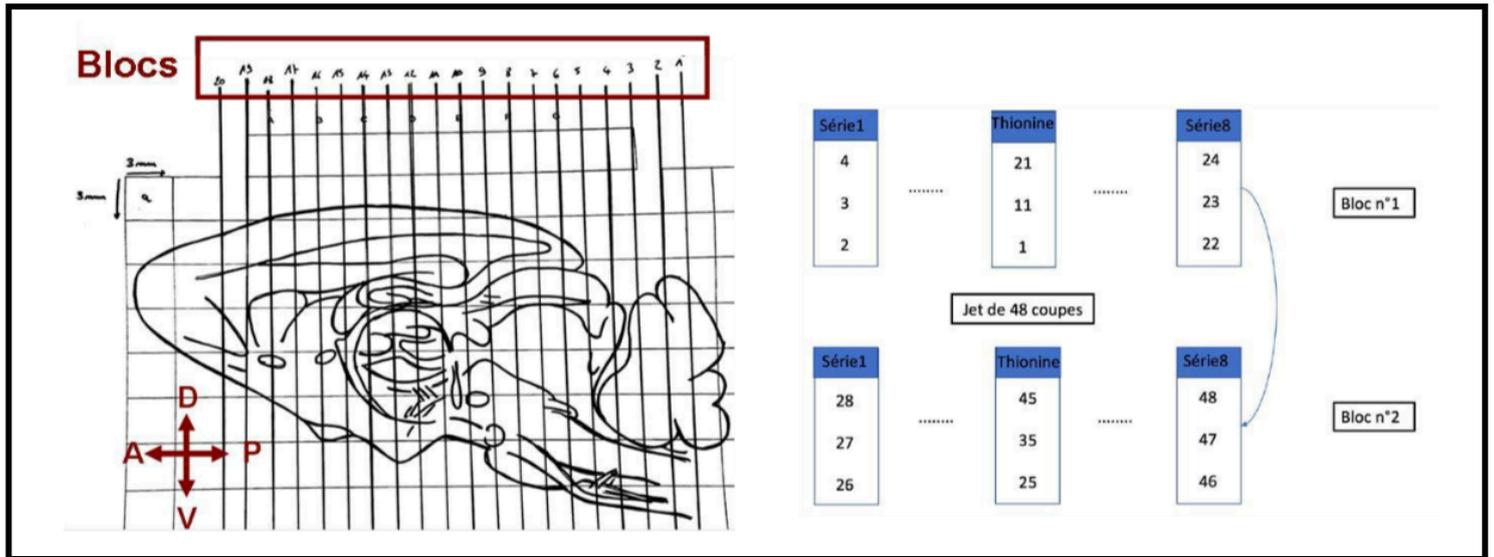


Figure 11 : **Représentation du plan de coupe des cerveaux de lapins adultes.** À gauche, schéma d'un cerveau de lapin adulte (en coupe sagittale) sur lequel on peut voir la répartition des différents blocs de coupes. Chaque trait représente un bloc de 24 coupes successives. À droite, Représentation de la position des coupes de cerveau. 3 coupes successives ont été mises sur la même lame pour une même série de marquage (par exemple, la série 1 de marquage correspond à la série de marquage à la cytochrome oxydase). Une lame dite « thionine » a été insérée entre les diverses séries afin d'avoir un repère anatomique.

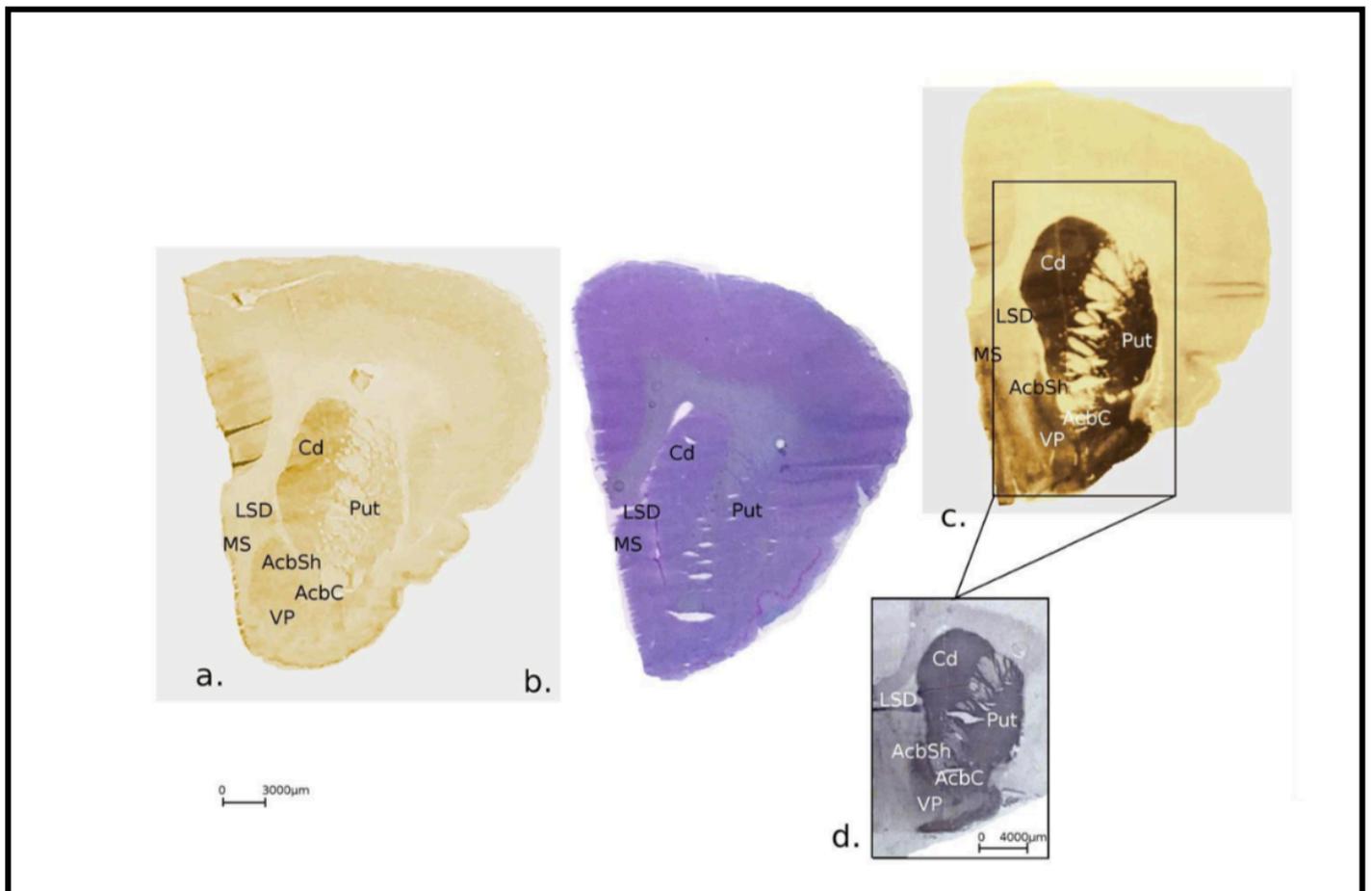


Figure 10 : Photographies de coupes de cerveau de lapin adulte F1 au niveau du striatum. a. Marquage à la cytochrome oxydase (CO). b. Marquage à la thionine. c. Marquage à l'acétylcholinestérase (AChE). d. Marquage à la tyrosine oxydase (TH). Image issue de l'atlas de l'encéphale de lapin, atlas réalisé par Grégoire Mencarelli, Benoît Olivier et Estefanía Bernal Meléndez sous la direction du Dr. Pascaline Bouillaud et du Dr. Henri Schroeder.

Ensuite, les lames ont été lavées en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 (3 × 5 min), puis déshydratées dans une série de bains d'éthanol (50%, 70%, 96%, 100%, 3 × 3 min, puis 2 × 5 min), et nettoyées au toluène (2 × 5 min). Les tissus ont ensuite été recouverts à l'Eukitt et une lamelle appliquée de manière à protéger les coupes ainsi marquées.

2.1.5. Quantification de l'activité de la cytochrome oxydase

À partir des standards (homogénats de cerveau d'épaisseurs variables dont on connaît l'activité enzymatique spécifique), on obtient une gamme permettant d'établir une relation de proportionnalité entre la densité optique mesurée et l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase. L'activité de la cytochrome oxydase est ainsi évaluée en mesurant la densité optique des zones d'intérêts à l'aide d'un analyseur d'images étalonné.

L'activité de la cytochrome oxydase des structures cérébrales d'intérêt a été mesurée par densitométrie numérisée avec un analyseur d'images (Biocom, Les Ulis, France). Pour cela, la densité optique d'une même région a été mesurée sur au moins trois coupes successives et les mesures converties en valeurs d'activité enzymatique exprimées en fmol/mg de tissu équivalent en se référant à la pente de la courbe liant densité optique et valeur d'activité enzymatique, déterminée à partir des standards précédemment évoqués (Gonzalez-Lima *et al.*, 1994).

2.1.6. Analyses statistiques de la cytochrome oxydase

Tous les résultats sont exprimés en moyenne ± E.S.MS. (erreur standard à la moyenne). Après avoir vérifié la condition d'égalité de la variance entre les groupes avec un test de Levene, une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs a été réalisée pour déterminer l'effet du sexe, du traitement et de l'interaction entre les 2 facteurs. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SPSS v16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les différences observées ont été considérées comme étant significatives au seuil de $p < 0,05$.

2.2. Exploration des fonctions cérébrales

2.2.1. Analyse histochimique de l'activité cholinergique cérébrale

L'étude des possibles altérations du système cholinergique cérébrale, système engagé dans la mise en place des circuits neuronaux et impliqué dans la régulation des autres systèmes neuromodulateurs, a été réalisée *via* l'analyse histochimique de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE).

2.2.2. Principe de l'analyse histochimique via l'AChE

L'activité AchE est utilisée pour marquer l'innervation cholinergique dans le système nerveux central (Gil-Bea *et al.*, 2005). Bien que l'AchE ne soit pas un marqueur spécifique puisque l'enzyme est présente à la fois dans les neurones présynaptiques et postsynaptiques, sa révélation histochimique nous permet d'en faire une évaluation quantitative.

De plus l'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur jouant un rôle crucial dans les mécanismes d'éveil et de plasticité neuronale cérébrale ; il est connu pour son implication dans la mise en place et l'évolution de diverses neuropathologies liées à l'apprentissage et la mémoire (Vanderwolf., 1988 ; Blokland., 1995). Puisque l'acétylcholine est métabolisée en acétyl-Co A et en choline l'acétylcholinestérase (AChE) (qui devient ainsi l'enzyme limitante du catabolisme de l'ACh), la distribution de l'AChE est étroitement associée à celle de l'acétylcholine ; l'activité de l'AChE peut ainsi être considérée comme un marqueur valide et fiable pour l'étude de l'intégrité des neurones cholinergiques et la distribution et de la densité des terminaisons cholinergiques dans diverses régions cérébrales (Gordon et Finch., 1984).

2.2.3. Marquage et analyse des tissus marqués à l'AChE

Tous les produits chimiques nécessaires à la technique de marquage ont été achetés auprès de Sigma- Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

Les coupes ont été incubées en même temps que des lames dites « standard » à l'obscurité et à température ambiante pendant 12 heures dans 180 ml de solution mère à laquelle avaient été ajoutés 208 mg d'iodure de S-acétylthiocholine et 5,4 mg d'éthopropazine. La solution mère était un tampon acétate de sodium 50 mM à pH 5,0 mélangé à une solution de sulfate de cuivre à 4,0 mM et à une solution de glycine à 16 mM. Ceci a été réalisé en ajoutant 6,8 g d'acétate de sodium, 1,0 g de cristaux de sulfate de cuivre et 1,2 g de glycine dans 1,0 L d'eau et en abaissant le pH à 5,0 avec du HCl.

La réaction a été arrêtée par rinçage de lames dans l'eau distillée pendant 1 minute. Les lames ont été révélées dans du sulfure de sodium à 1% avec du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 pendant 10 minutes, puis rincées à l'eau distillée trois fois pendant 5 minutes.

Le tissu a été fixé dans du formol tamponné (formaldéhyde à 4% (v/v)) à température ambiante pendant 30 minutes, puis rincé avec de l'eau distillée (3 × 5 min). Enfin, les lames ont été déshydratées dans une série de bains d'éthanol (50%, 70%, 96%, 100%, 3 × 3 minutes,

puis 2 × 5 minutes), et nettoyées au toluène (2 × 5 min). Les tissus ont ensuite été recouverts à l'Eukitt et une lamelle appliquée de manière à protéger les coupes ainsi marquées (Figure 11).

2.2.4. Quantification de l'activité de l'AChE

Les standards utilisés pour l'étude de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase ont été préparés à partir d'homogénats de cerveau entier de lapins adultes. L'activité enzymatique des homogénats cérébraux a été mesurée biochimiquement par spectrophotométrie selon le protocole décrit par Ellman et collaborateurs, et modifiée par Dumont et collaborateurs (Ellman et al, 1961 ; Dumont et al, 2006). En bref, l'homogénat cérébral (pH=8) a été dilué avec de l'acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoate (DTNB, 0,01 M) et de l'iodure d'acétylthiocholine (75 mM). La thiocholine, formée lors de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine, réagit rapidement avec le DTNB pour libérer un anion coloré, le 5-thio-2-nitrobenzoate, présentant une absorption maximale à 412 nm.

L'activité enzymatique spécifique de l'acétylcholinestérase a été calculée à partir de la pente linéaire de la courbe obtenue et était de 8,41 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu. Des sections d'homogénat cérébral d'épaisseur variable ont été utilisées pour couvrir toute la gamme d'activité mesurée dans les différentes structures cérébrales. Dans nos conditions expérimentales, l'intensité de la coloration était fortement corrélée à l'épaisseur des sections standard (fonction linéaire $r = 0.997$).

Ceci nous a ainsi permis de réaliser une gamme permettant d'établir une relation de proportionnalité entre la densité optique mesurée et l'activité enzymatique de l'AChE, laquelle a été évaluée en mesurant la densité optique des zones d'intérêts à l'aide d'un analyseur d'images étalonné.

L'activité de l'AChE des structures cérébrales d'intérêt a été mesurée par densitométrie numérisée avec un analyseur d'images (Biocom, Les Ulis, France). La densité optique d'une même région a été mesurée sur au moins trois coupes successives et les mesures converties en valeurs d'activité enzymatique exprimées en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu équivalent en se référant à la pente de la courbe liant densité optique et valeur d'activité enzymatique déterminée à partir des standards précédemment évoqués.

2.2.5. Analyses statistiques de l'AchE

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm E.S.M. (erreur standard à la moyenne). Après avoir vérifié la condition d'égalité de la variance entre les groupes avec un test de Levene, une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs a été réalisée pour déterminer l'effet du sexe, du traitement et de l'interaction entre les 2 facteurs. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel SPSS v16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Les différences observées ont été considérées comme étant significatives au seuil de $p < 0,05$.

Résultats

1. Analyses histologiques de la cytochrome oxydase

Les résultats de l'analyse des 52 régions considérées pour l'étude sont présentés dans différents tableaux visant à regrouper les régions par système fonctionnel de manière à mettre en évidence les possibles effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le métabolisme neuronal chez les animaux au stade adulte (PND190) en prenant en compte de possibles variations différentes selon le sexe de l'animal.

1.1. Systèmes sensoriels

Les analyses statistiques montrent que ce type d'exposition n'altère pas l'activité métabolique au niveau du système auditif quels que soient la région considérée de même que le sexe de l'animal (Tableau 1). Par ailleurs, aucune interaction significative n'a été observée entre les 2 facteurs dans ce système (Tableau 1). Il est tout de même intéressant de remarquer que l'activité neuronale au niveau du cortex auditif semble moins importante chez les mâles par rapport aux femelles (-13%), cette observation étant à la limite du seuil de significativité ($F=3,604$, $p=0,078$) (Annexe, Figure 9).

En ce qui concerne le système visuel (Tableau 1), on observe une diminution significative de l'activité neuronale au niveau du collicule supérieur chez les animaux exposés, par rapport aux animaux témoins ($F=5,004$, $p=0,045$) qui semble plus importante chez les mâles. Pour autant, aucune interaction significative avec le sexe n'a été calculée ($F= 2,869$, $p=0,116$) (Annexe, Figure 6).

L'analyse statistique n'a pas montré d'effets significatifs de la pollution, du sexe ou d'interaction entre les deux dans les aires olfactives étudiées (Tableau 1).

1.2. Système moteur

Concernant le système moteur (Tableau 2), on note une diminution significative de l'activité neuronale au niveau du putamen chez les animaux exposés par rapport aux animaux témoins alors qu'aucun effet du sexe n'est observé (Annexe, Figure 11). De même, aucune interaction significative entre les 2 facteurs n'a été observée. Au niveau des différentes composantes cellulaires du cervelet, il apparaît que l'activité neuronale est moins importante chez les animaux exposés par rapport aux animaux témoins au niveau de la couche moléculaire cérébelleuse, et ce de façon sexe-dépendante (Annexe, Figure 2). Pour autant,

ces observations sont à la limite du seuil de significativité ($F=3,524$, $p=0,085$) en ce qui concerne l'effet de l'exposition et celui du sexe ($F=3,539$, $p=0,084$).

1.3. Régions sous corticales et cortex associés

L'analyse statistique sur les structures étudiées au niveau du tronc cérébral n'a pas montré d'effets significatifs du traitement ou du sexe ni d'interaction entre les deux (Tableau 3).

Au niveau des aires thalamiques (Tableau 3), l'analyse statistique fait apparaître une réduction de l'activité neuronale au niveau du noyau latéral chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles, mais cette observation est à la limite du seuil de significativité ($F=3,714$, $p=0,080$) (Annexe, Figure 10). Par ailleurs, on observe une différence significative entre les mâles et les femelles dans cette région ainsi qu'une interaction significative entre les deux facteurs indiquant un effet de la pollution différent selon que l'on soit chez les mâles ou les femelles.

Il est également à noter une différence notable entre mâles et femelles au niveau du noyau dorso-médian de ce système, mais sans qu'il y ait d'effet provenant de la pollution ou une interaction entre les deux facteurs (Tableau 3).

En ce qui concerne les structures hypothalamiques (Tableau 3), seule une diminution significative de l'activité neuronale au niveau du noyau postérieur de l'hypothalamus est observée chez les animaux exposés par rapport aux animaux témoins, mais cette différence n'est pas sexe-dépendante (Annexe, Figure 10). Il n'y a ainsi aucune interaction entre les 2 facteurs de variation dans cette région du cerveau.

Concernant le système limbique (Tableau 3), on note une diminution significative de l'activité neuronale au niveau du septum latéral sous l'effet de la pollution, mais pas sous l'effet du sexe (Annexe, Figure 15). De même, aucune interaction significative n'a été observée dans cette région cérébrale.

Dans les territoires hippocampiques, on constate qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux groupes d'animaux (pollué vs témoin). Par contre, on note des différences significatives sexe-dépendante au niveau de plusieurs aires de la corne d'Amon, CA1 et CA2 (Tableau 4) (Annexe, Figure 10). Enfin, il est à noter une diminution significative de l'activité de la cytochrome oxydase dans le noyau médian de l'habenula chez les animaux exposés aux PFD par rapport aux témoins, diminution qui est observée de la même manière

chez les mâles et les femelles (pas d'effet significatif du sexe) et qui ne donne lieu à aucune interaction avec le facteur pollution.

Tableau I : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des systèmes sensoriels.

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
<i>Système auditif</i>											
Collicule inférieur	41,9 ± 11,1	44,3 ± 8,4	37,7 ± 4,3	47,1 ± 10,4	1;10	1,524	ns	0,023	ns	0,546	ns
Cortex Auditif	35,9 ± 4,3	42,3 ± 6,3	34,7 ± 2,3	38,8 ± 8,2	1;14	3,604	0,078	0,752	ns	0,157	ns
Olive Supérieure	42,5 ± 0,0	46,5 ± 0,9	38,3 ± 5,9	43,4 ± 3,1	1;8	3,252	ns	2,066	ns	0,045	ns
Lémnisque latéral	-	8,5	8,5	-	0;0	-	-	-	-	-	-
<i>Système visuel</i>											
Collicule supérieur	49,6 ± 2,9	51,8 ± 2,0	42,0 ± 5,7	48,3 ± 6,3	1;12	2,869	ns	5,004	*	0,658	ns
Cortex Visuel	38,2 ± 7,4	40,4 ± 5,7	32,3 ± 5,0	37,0 ± 5,1	1;14	1,562	ns	2,894	ns	0,219	ns
Aire Pré-optique	33,7 ± 3,8	33,4 ± 0,0	33,0 ± 5,3	35,8 ± 0,0	1;5	0,098	ns	0,048	ns	0,162	ns
Noyau Supra-optique	34,3 ± 0,0	-	30,2 ± 8,1	32,1 ± 0,7	1;4	0,096	ns	0,273	ns	-	-
<i>Système olfactif</i>											
Cortex Piriforme	47,8 ± 12,8	50,7 ± 9,1	52,7 ± 7,1	49,9 ± 8,7	1;13	0,999	ns	0,667	ns	0,555	ns
Tubercule olfactif	40,7 ± 5,4	54,2 ± 8,5	43,5 ± 4,6	49,6 ± 15,7	1;10	2,528	ns	0,023	ns	0,36	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau II : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau du système moteur

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
Système moteur											
Cortex Moteur	34,6 ± 6,8	40,2 ± 6,3	35,0 ± 7,9	35,4 ± 5,8	1;11	0,734	ns	0,394	ns	0,56	ns
Caudé	56,8 ± 3,9	51,8 ± 11,7	47,3 ± 6,4	50,6 ± 6,0	1;14	0,053	ns	2,352	ns	1,398	ns
Putamen	48,0 ± 6,5	42,8 ± 5,8	41,8 ± 4,5	38,7 ± 3,4	1;14	3,022	ns	4,595	*	0,201	ns
Noyaux Sous Thalamique	42,6 ± 4,5	46,0 ± 16,4	43,1 ± 6,5	43,5 ± 13,9	1;11	0,113	ns	0,034	ns	0,071	ns
Substance Noire Réticulata	24,1 ± 0,7	22,3 ± 0,7	27,0 ± 0,7	22,9 ± 0,8	1;13	0,086	ns	1,735	ns	0,095	ns
Substance Noire Compacta	22,0 ± 0,6	30,7 ± 0,7	26,0 ± 0,6	27,9 ± 0,9	1;13	3,471	0,092	0,039	ns	1,545	ns
Noyau rouge	-	-	32,2 ± 2,7	45,6 ± 0,0	1;2	18,499	ns	-	-	-	-
Noyaux du Pont	34,9 ± 0,7	39,4 ± 0,6	35,9 ± 4,7	29,3 ± 6,3	1;4	0,144	ns	2,679	ns	4,009	ns
Cervelet											
Noyau Denté	30,3 ± 10,7	34,3 ± 4,1	27,9 ± 5,0	25,0 ± 0,0	1;9	0,016	ns	2,083	ns	0,718	ns
Noyau Interposé	27,2 ± 3,6	33,2 ± 6,9	27,4 ± 6,2	26,0 ± 0,0	1;9	0,579	ns	1,326	ns	1,49	ns
Cellules de Purkinje	52,1 ± 6,4	50,1 ± 6,8	45,4 ± 6,9	48,5 ± 4,3	1; 12	0,031	ns	1,706	ns	0,652	ns
Couche Granulaire	42,2 ± 4,3	43,4 ± 3,2	37,9 ± 5,4	41,1 ± 2,0	1; 13	1,193	ns	2,737	ns	0,275	ns
Couche Moléculaire	42,8 ± 4,6	44,0 ± 3,3	36,9 ± 4,4	42,8 ± 1,0	1; 12	3,539	0,084	3,524	0,085	1,529	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau III : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en μ mole/min/mg de tissus) au niveau des régions sous-corticales (tronc cérébral, thalamus, hypothalamus, et système limbique) et de leurs cortex associés.

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
Tronc cérébral											
Locus Coeruleus	32,2 ± 0,0	32,5 ± 2,1	29,3 ± 1,0	32,7 ± 1,3	1;7	3,78	0,09	2,206	ns	2,753	ns
Noyau Interpédonculaire	59,8 ± 0,0	60,4 ± 0,0	39,2 ± 14,1	46,6 ± 0,0	1;2	0,099	ns	1,801	ns	0,069	ns
Thalamus											
Ventre médial	43,4 ± 2,0	53,7 ± 5,9	43,2 ± 4,8	43,2 ± 8,6	1;11	2,935	ns	3,166	ns	2,954	ns
Dorso Latéral	32,8 ± 3,8	42,4 ± 5,8	32,7 ± 2,6	35,9 ± 6,4	1;11	6,693	*	1,739	ns	1,663	ns
Latéral	17,3 ± 4,5	31,5 ± 5,5	20,6 ± 5,0	18,0 ± 5,5	1;11	4,771	*	3,714	0,08	10,198	**
Corps genouillé médian	40,6 ± 3,9	39,4 ± 7,1	39,2 ± 3,4	42,3 ± 4,9	1;12	0,152	ns	0,092	ns	0,709	ns
Corps genouillé latéral	44,8 ± 7,5	44,4 ± 3,7	36,8 ± 5,3	41,7 ± 9,7	1;13	0,473	ns	2,567	ns	0,628	ns
Hypothalamus											
Postérieur	37,5 ± 0,4	37,0 ± 4,8	34,6 ± 3,0	31,2 ± 1,0	1;6	1,238	ns	6,557	*	0,721	ns
Latéral	34,1 ± 0,0	37,4 ± 4,8	33,1 ± 0,0	29,4 ± 5,5	1;3	0,002	ns	1,038	ns	0,624	ns
Aire hypothalamique antérieure	35,8 ± 1,8	35,4 ± 2,7	33,0 ± 0,0	29,9 ± 3,10	1;3	0,68	ns	4,077	ns	0,426	ns
Dorso médian	-	33,7 ± 2,7	33,6 ± 0,0	33,4 ± 5,3	1;2	0,004	ns	0,002	ns	-	-
Ventre médian	-	35,2 ± 0,0	32,6 ± 3,8	32,9 ± 1,7	1;2	0,014	ns	0,388	ns	-	-
Corps mamillaire médian	37,0 ± 0	44,7 ± 0,0	-	49,8 ± 0,0	1;0	-	-	-	-	-	-
Corps mamillaire latéral	27,5 ± 0	41,4 ± 0,0	41,6 ± 8,2	45,1 ± 0,0	1;1	1,292	ns	1,349	ns	0,476	ns
Système limbique											
Cortex Prélimbique	36,1 ± 6,7	39,1 ± 1,8	38,4 ± 2,1	40,6 ± 6,4	1;11	0,987	ns	0,521	ns	0,029	ns
Cortex Cingulaire	40,8 ± 9,7	41,9 ± 5,5	39,7 ± 6,8	39,5 ± 4,6	1;10	0,014	ns	0,19	ns	0,028	ns
Cortex Entorhinale	35,0 ± 5,6	36,1 ± 5,5	32,4 ± 2,5	33,2 ± 4,9	1;13	0,174	ns	1,48	ns	0,004	ns
Aire Périaqueducal	35,7 ± 6,9	39,1 ± 5,3	33,0 ± 3,8	35,5 ± 6,0	1;10	0,925	ns	1,068	ns	0,021	ns
Aire Ventrale Tegmentale	18,0 ± 0,4	20,8 ± 0,6	22,1 ± 1,2	26,8 ± 1,0	1;10	2,646	ns	4,781	0,065	0,182	ns
Septum latéral	44,3 ± 3,1	44,7 ± 9,2	36,5 ± 2,4	34,8 ± 5,2	1;9	0,043	ns	8,722	*	0,133	ns
Noyau accumbens	39,7 ± 4,3	44,5 ± 3,1	40,3 ± 3,3	45,1 ± 11,3	1;10	1,667	ns	0,025	ns	0	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau IV : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique cérébrale de la cytochrome oxydase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (hippocampe, amygdale et habenula) et de leurs cortex associés

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
<i>Hippocampe</i>											
gyrus denté	40,4 ± 6,7	43,6 ± 8,4	35,6 ± 7,4	42,7 ± 10,2	1;13	1,537	ns	0,464	ns	0,223	ns
CA1	35,3 ± 3,6	40,3 ± 3,7	34,3 ± 2,8	39,0 ± 5,0	1;13	6,359	*	0,348	ns	0,01	ns
CA2	44,0 ± 6,6	52,2 ± 10,4	42,2 ± 6,2	48,3 ± 11,0	1;13	2,765	*	0,45	ns	0,057	ns
CA3	37,3 ± 7,0	41,4 ± 3,1	36,3 ± 5,9	39,9 ± 7,7	1;13	1,437	ns	0,155	ns	0,003	ns
<i>Amygdale</i>											
Médiane	30,4 ± 6,7	34,5 ± 4,5	32,4 ± 1,2	33,5 ± 11,1	1;12	0,58	ns	0,024	ns	0,201	ns
Baso médiane	33,1 ± 3,2	37,3 ± 4,7	32,0 ± 1,5	32,8 ± 4,1	1;12	2,031	ns	2,471	ns	0,902	ns
Baso-latérale	30,7 ± 5,2	40,7 ± 12,4	32,0 ± 1,7	33,9 ± 4,4	1;12	2,753	ns	0,61	ns	1,291	ns
Noyau central	37,2 ± 7,6	33,9 ± 7,1	32,9 ± 2,0	35,3 ± 3,8	1;10	0,024	ns	0,272	ns	1,023	ns
<i>Noyaux de l'habenula</i>											
Noyaux médian	45,8 ± 0	43,3 ± 0	35,2 ± 1,8	35,7 ± 0,4	1;2	0,765	ns	65,068	*	1,669	ns
Noyaux latéral	40,0 ± 0	44,5 ± 0	39,2 ± 0,9	44,5 ± 0,0	1;1	22,078	ns	0,611	ns	-	-
VTA	18,0 ± 0,4	20,8 ± 0,6	22,0 ± 1,2	26,8 ± 1,0	1;10	2,646	ns	4,781	0,065	0,182	ns

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

2. Analyses histologiques de l'AChE

Tout comme pour la cytochrome oxydase, les résultats sont issus de l'analyse des 53 régions considérées pour l'étude. Ils sont présentés dans différents tableaux visant à regrouper les régions par système fonctionnel de manière à mettre en évidence les possibles effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité de l'acétylcholine estérase chez les animaux au stade adulte (PND190) en prenant en compte de possibles variations différentes selon le sexe de l'animal.

2.1. Systèmes sensoriels

Les analyses statistiques montrent que ce type d'exposition n'altère pas l'activité de l'acétylcholine estérase au niveau du système auditif quelle que soit la région considérée de même que le sexe de l'animal (Tableau 1). Par ailleurs, aucune interaction significative n'a été observée entre les 2 facteurs dans ce système (Tableau 1).

En ce qui concerne le système visuel (Tableau 1), on note une augmentation non significative de l'activité de l'enzyme au niveau du cortex visuel chez les animaux exposés par rapport aux animaux témoins ($F=3,184$, $p=0,098$) qui semble plus importante chez les femelles (Annexe, Figure 8). Pour autant, aucune interaction significative avec le sexe n'a été calculée ($F= 0,183$, $p= n.s$).

L'analyse statistique montre une nouvelle interaction entre l'effet de l'exposition et celui du sexe dans les aires olfactives étudiées (Tableau 1). C'est au niveau du tubercule olfactif que celle-ci apparaît indiquant un effet différent selon le sexe de l'animal ($F=4,256$, $p = 0,060$ avec augmentation chez les mâles et diminution chez les femelles) (Annexe, Figure 16).

2.2. Système moteur

Concernant le système moteur (Tableau 2), on note une variation significative de l'activité de l'acétylcholine estérase au niveau du putamen chez les animaux exposés selon leur sexe ($F = 4,675$, $p = 0,048$ avec là aussi augmentation chez les mâles et diminution chez les femelles) (Annexe, Figure 11). Toujours en prenant en compte le sexe et la pollution, on note une nouvelle tendance au niveau du noyau caudé ($F = 3,280$, $p = 0,092$) (Annexe, Figure 11). En ce qui concerne les différentes composantes cellulaires du cervelet, il apparaît que l'activité enzymatique de l'acétylcholine estérase est variable chez les animaux exposés par

rapport aux animaux témoins au niveau de la couche moléculaire cérébelleuse, et ce de façon sexe-dépendante (Annexe, Figure 2). Pour autant, ces observations sont à la limite du seuil de significativité pour l'effet du sexe ($F=3,737$, $p=0,077$).

2.3. Régions sous corticales et cortex associés

L'analyse statistique sur les structures étudiées au niveau du tronc cérébral n'a pas montré d'effets significatifs du traitement ou du sexe ainsi que d'interaction entre les deux (Tableau 2).

Au niveau des aires thalamiques (Tableau 3), l'analyse statistique fait apparaître une variation de l'activité enzymatique au niveau du noyau médial chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles, mais cette observation est à la limite du seuil de significativité ($F=4,464$, $p=0,058$) (Annexe, Figure 9). Par ailleurs, on observe au niveau du noyau ventromédial que l'interaction entre les 2 facteurs est significative, indiquant un effet de la pollution différent selon que l'on soit chez les mâles ou les femelles (Annexe, Figure 9).

Il est également à noter une différence significative entre mâles et femelles au niveau du noyau accumbens que ce soit au niveau de la partie « core » ou de la partie « shell », mais sans qu'il y ait d'effet de la pollution ou une interaction entre les 2 facteurs (Tableau 4) (Annexe, Figure 15).

Concernant le système limbique (Tableau 4 et 5), on note une augmentation non significative de l'activité de l'acétylcholine estérase au niveau de l'aire tegmentale ventrale et du septum latéral sous l'effet de la pollution, mais pas sous l'effet du sexe (Annexe, Figures 8 et 15). De même, aucune interaction significative n'a été observée dans ces régions cérébrales.

Dans les territoires hippocampiques, on constate qu'il n'y a pas de différences significatives entre les deux groupes d'animaux (pollué vs témoin). Par contre, on note une nouvelle interaction non significative entre l'effet de l'exposition et celui du sexe au niveau d'une aire de la Corne d'Amon, CA2 (Tableau 3) (Annexe, Figure 10). Enfin, il est à noter une perturbation significative de l'activité de l'acétylcholine estérase dans le noyau de Meynert (Annexe, Figure 12). On observe que l'interaction entre les 2 facteurs est significative, indiquant une nouvelle fois, un effet de la pollution différent selon le sexe de l'animal ($F = 14,206$, $p = 0,003$).

Tableau V : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des systèmes sensoriels.

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
<i>Système auditif</i>											
Collicule inférieur	18,7 ± 0,6	20,6 ± 1,6	18,9 ± 0,9	19,8 ± 0,5	1;13	0,511	n.s	0,006	n.s	0,147	n.s
Cortex Auditif	6,5 ± 0,4	7,0 ± 0,6	7,0 ± 0,5	7,5 ± 0,5	1;17	0,174	n.s	0,358	n.s	0,016	n.s
Olive Supérieure	12,9 ± 1,4	17,2 ± 0,8	15,2 ± 0,6	13,4 ± 0,6	1;8	0,553	n.s	0,190	n.s	4,006	n.s
<i>Système visuel</i>											
Collicule supérieur	24,6 ± 0,8	25,0 ± 0,9	25,2 ± 1,2	26,0 ± 0,8	1;15	0,088	n.s	0,227	n.s	0,002	n.s
Cortex Visuel	6,6 ± 0,3	6,1 ± 0,5	8,0 ± 0,4	7,0 ± 0,4	1;16	1,335	n.s	3,184	0,098	0,183	n.s
<i>Système olfactif</i>											
Cortex Piriforme	11,0 ± 0,5	12,9 ± 0,9	13,5 ± 1,2	13,4 ± 0,5	1;16	0,356	n.s	1,798	n.s	0,845	n.s
Tubercule olfactif	27,8 ± 0,5	31,5 ± 1,4	33,9 ± 1,7	29,9 ± 1,0	1;16	0,058	n.s	1,590	n.s	4,256	0,060

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau VI : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau du système moteur

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
Système moteur											
Cortex Moteur	5,8 ± 0,5	5,6 ± 0,7	6,8 ± 0,4	6,0 ± 0,3	1;14	0,426	n.s	0,787	n.s	0,183	n.s
Caudé	30,1 ± 0,8	32,5 ± 2,2	34,7 ± 1,4	28,6 ± 1,0	1;17	0,796	n.s	0,076	n.s	3,280	0,092
Putamen	32,8 ± 0,7	36,8 ± 1,1	38,2 ± 1,4	34,4 ± 0,8	1;17	0,016	n.s	0,920	n.s	4,675	*
Noyaux Sous Thalamique	12,5 ± 1,3	14,1 ± 0,6	16,6 ± 1,1	13,3 ± 0,8	1;14	0,613	n.s	0,811	n.s	1,394	n.s
Substance Noire Compacta	13,0 ± 0,4	13,5 ± 1,1	13,9 ± 0,4	14,9 ± 0,6	1;13	0,408	n.s	1,031	n.s	0,038	n.s
Substance Noire Réticulata	8,4 ± 0,5	7,5 ± 1,5	9,7 ± 0,5	8,8 ± 0,9	1;13	0,496	ns	0,899	n.s	0,00	n.s
Noyau Pédonculopontin Tegmental	17,8 ± 1,0	17,8 ± 0,5	17,5 ± 1,0	19,0 ± 0,6	1;12	0,291	n.s	0,033	n.s	0,300	n.s
Noyau Trigéminal	8,8 ± 1,0	10,8 ± 1,2	10,8 ± 0,9	12,6 ± 1,0	1;10	1,538	n.s	0,920	n.s	0,005	n.s
Globus Pallidus	11,6 ± 1,2	11,1 ± 0,7	12,3 ± 0,4	11,5 ± 0,9	1;17	0,198	n.s	0,161	n.s	0,010	n.s
Cervelet											
Noyau Denté	9,4 ± 0,4	10,2 ± 0,4	9,9 ± 0,9	10,0 ± 1,2	1;10	0,060	n.s	0,018	n.s	0,047	n.s
Noyau Interposé	6,7 ± 0,4	8,1 ± 0,2	5,9 ± 0,5	7,4 ± 1,0	1;10	1,905	n.s	0,512	n.s	0,001	n.s
Cellules de Purkinje	11,5 ± 0,6	14,3 ± 1,7	14,4 ± 1,6	13,2 ± 0,6	1;15	0,115	n.s	0,193	n.s	0,861	n.s
Couche Granulaire	9,9 ± 0,5	16,4 ± 2,6	11,5 ± 0,7	11,4 ± 0,6	1;15	2,482	n.s	0,724	n.s	2,782	n.s
Couche Moléculaire	7,3 ± 0,6	11,5 ± 1,3	8,5 ± 0,7	9,7 ± 0,6	1;15	3,737	0,077	0,024	n.s	1,341	n.s

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau VII : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissu) au niveau des régions sous-corticales (hippocampe, thalamus) et de leur cortex associé.

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
Hippocampe											
gyrus denté	7,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	8,9 ± 0,6	7,7 ± 0,3	1;15	0,533	n.s	1,354	n.s	0,591	n.s
CA1	4,0 ± 0,3	4,5 ± 0,4	4,9 ± 0,5	4,4 ± 0,3	1;16	0,018	n.s	0,408	n.s	0,612	n.s
CA2	8,8 ± 0,2	11,7 ± 1,0	10,8 ± 0,6	9,6 ± 0,5	1;16	0,630	n.s	0,007	n.s	4,269	0,059
CA3	9,6 ± 0,5	10,1 ± 0,7	9,8 ± 0,7	9,0 ± 0,4	1;16	0,071	n.s	0,069	n.s	0,561	n.s
Thalamus											
Médial	10,0 ± 0,5	13,4 ± 0,5	12,8 ± 0,6	11,0 ± 1,0	1;14	0,299	n.s	0,057	n.s	4,464	0,058
Ventro médial	7,7 ± 0,3	9,9 ± 0,4	8,8 ± 0,6	7,4 ± 0,6	1;14	0,359	n.s	0,931	n.s	5,450	*
Dorso Latéral	19,98 ± 0,6	20,2 ± 1,0	17,7 ± 0,9	19,3 ± 0,9	1;14	0,019	n.s	0,337	n.s	0,609	n.s
Latéral	7,0 ± 0,4	7,5 ± 0,2	7,4 ± 0,5	7,4 ± 0,5	1;13	0,017	n.s	0,134	n.s	0,047	n.s
Postérieur	24,6 ± 0,7	22,4 ± 1,4	23,7 ± 2,1	24,9 ± 1,7	1;12	0,064	n.s	0,143	n.s	0,382	n.s
Corps genouillé médian	8,5 ± 0,3	11,1 ± 0,3	8,8 ± 0,7	8,7 ± 0,6	1;14	1,007	n.s	0,682	n.s	1,757	n.s
Corps genouillé latéral	9,4 ± 0,4	10,0 ± 0,7	9,5 ± 0,5	10,0 ± 0,6	1;16	0,278	n.s	0,005	n.s	0,007	n.s
Corps genouillé ventral	18,2 ± 1,1	18,9 ± 1,3	19,9 ± 1,4	14,6 ± 1,0	1;12	1,148	n.s	0,158	n.s	1,917	n.s
Cortex											
Cortex Cingulaire	6,9 ± 0,6	7,0 ± 0,7	9,8 ± 0,8	6,4 ± 0,4	1;14	2,495	n.s	1,195	n.s	2,748	n.s

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau VIII : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (système limbique et amygdale).

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
Système limbique											
Ventral Pallidum	25,2 ± 0,5	29,9 ± 3,0	33,6 ± 1,0	27,5 ± 0,9	1;13	0,084	n.s	1,340	n.s	4,249	0,066
Aire Tegmentale Ventrale	9,0 ± 0,5	9,3 ± 0,4	10,2 ± 0,4	10,6 ± 0,7	1;10	0,977	n.s	4,002	0,086	0,351	n.s
Cortex Entorhinale	6,7 ± 0,3	7,8 ± 0,7	7,4 ± 0,7	8,3 ± 0,6	1;16	0,527	n.s	0,437	n.s	0,056	n.s
Septum Médian	20,9 ± 0,8	15,3 ± 0,8	24,4 ± 1,5	19,1 ± 1,3	1;7	3,082	n.s	1,480	n.s	0,003	n.s
Septum latéral	8,2 ± 0,5	6,98 ± 0,4	11,0 ± 0,5	8,6 ± 0,8	1;9	2,902	n.s	4,115	0,089	0,342	n.s
Noyau accumbens Core	22,0 ± 0,8	25,1 ± 1,9	30,4 ± 1,5	23,5 ± 1,0	1;14	0,738	n.s	2,221	n.s	4,824	*
Noyau accumbens Shell	22,4 ± 0,4	28,8 ± 2,1	32,38 ± 1,3	24,7 ± 0,7	1;13	0,109	n.s	1,940	n.s	10,670	*
Amygdale											
Médiane	12,5 ± 0,2	11,4 ± 0,8	12,6 ± 1,0	10,7 ± 1,5	1;14	1,072	n.s	0,008	n.s	0,114	n.s
Baso médiane	27,4 ± 0,8	29,7 ± 1,6	31,9 ± 1,1	28,9 ± 1,0	1;15	0,086	n.s	0,953	n.s	1,691	n.s
Baso-latérale	16,4 ± 0,9	16,3 ± 1,9	16,8 ± 1,0	15,8 ± 0,3	1;14	0,089	n.s	0,002	n.s	0,076	n.s
Noyau central	15,8 ± 0,6	17,4 ± 0,9	19,3 ± 1,3	16,0 ± 1,4	1;12	0,269	n.s	0,406	n.s	1,705	n.s

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Tableau IX : Effet d'une exposition gestationnelle aux PFD chez le lapin sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (exprimée en $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ de tissus) au niveau des régions sous-corticales (système limbique et hypothalamus).

Structures	Témoins		Exposés		ddl	Effets liés au au sexe		Effets liés à l'exposition		Interaction sexe*exposition	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle		F	P	F	P	F	P
<i>Système limbique</i>											
Noyau de Meynert	17,4 ± 1,0	25,5 ± 0,7	27,5 ± 1,3	21,3 ± 1,3	1;14	0,113	n.s	2,739	n.s	14,206	*
Cortex Prélimbique	7,0 ± 0,3	8,0 ± 0,1	8,8 ± 0,6	7,2 ± 0,2	1;12	0,407	n.s	0,713	n.s	3,288	n.s
Aire Périacqueducalé	10,1 ± 0,3	10,6 ± 0,3	10,4 ± 0,5	11,4 ± 0,7	1;13	0,651	n.s	0,553	n.s	0,085	n.s
Locus Coeruleus	16,5 ± 1,7	11,8 ± 0,4	14,3 ± 1,1	13,6 ± 0,3	1;10	2,013	n.s	0,034	n.s	1,435	n.s
<i>Hypothalamus</i>											
Postérieur	8,0 ± 1,4	8,3 ± 0,4	9,0 ± 0,9	6,2 ± 0,2	1;8	0,556	n.s	0,036	n.s	0,798	n.s

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante sont présentées pour chaque effet principal (sexe et pollution) et pour l'interaction entre les deux.

* $p < 0,05$, effet significatif du sexe, de la pollution et/ou de l'interaction entre les deux, n.s.= non significatif, ddl = degrés de liberté

Discussion

1. Effets des polluants environnementaux d'après l'analyse histochimique

Les travaux de Crépeaux et al. ont montré qu'une exposition gestationnelle à des polluants environnementaux (HAP pour hydrocarbures aromatiques polycycliques) menait à une perturbation de l'activité neuronale dans plusieurs structures impliquées dans les circuits sensoriel et moteur mettant en évidence qu'une telle exposition aux HAP pouvait altérer le métabolisme cérébral de la descendance à PN10 et PN21 (Crépeaux *et al.*, 2014). Cependant aucune altération significative n'a été observée sur les cerveaux des animaux adultes, suite à ce même type d'exposition (Crépeaux *et al.*, 2013). Ces résultats semblent donc suggérer que les modifications précoces induites par une exposition gestationnelle aux HAP n'ont pas de répercussion à l'âge adulte.

Dans notre étude, la mesure de l'activité de la cytochrome oxydase parmi les 52 régions cérébrales choisies n'a pas mis en évidence d'altérations fonctionnelles dans un circuit neuronal précis, mais des diminutions significatives de l'activité limitée à des régions précises non ciblées qui sont le collicule supérieur, le putamen, l'hypothalamus postérieur, le septum latéral et le thalamus latéral et la couche moléculaire du cortex cérébelleux. Un intérêt particulier a été porté à plusieurs structures de nature dopaminergique suite à une campagne de marquage de la dopamine dans la suite de notre étude. Cette campagne nous a permis de revenir sur des structures marquées en cytochrome oxydase et qui n'avaient pas été analysées du fait qu'elles étaient difficiles à localiser. On note parmi celles-ci, une augmentation significative de l'intensité du marquage à la cytochrome oxydase dans l'aire tegmentale ventrale. Peu ou pas d'interaction du facteur pollution avec le sexe n'a été observée.

Concernant l'acétylcholine estérase, la mesure de son activité dans 53 régions cérébrales incluant entre autres les différentes structures dopaminergiques étudiées au niveau de la cytochrome oxydase a permis de montrer des variations significatives entre animaux exposés et contrôles dans 5 régions en interaction avec le sexe (augmentation chez les mâles, diminution chez les femelles) dont une structure dopaminergique qui est le noyau accumbens (core et shell). Des tendances significatives à l'augmentation de cette activité ont été également observées sans interaction avec le sexe dans plusieurs régions, dont le septum, l'aire tegmentale ventrale et le pallidum qui sont également des régions de nature dopaminergique.

De façon intéressante, on observe une interaction entre les effets du sexe et de l'exposition au niveau du cortex prélimbique et du cingulum ($p=0,009$ et $p=0,087$, respectivement) avec des augmentations observées préférentiellement chez les mâles dans les deux régions.

Il ressort donc de cette étude histochimique que l'exposition précoce aux particules de fumées de diesel est à même d'induire des modifications de l'activité fonctionnelle cérébrale à l'âge adulte contrairement aux HAP.

Cela suggère une toxicité retardée de cette exposition pour le cerveau avec une sensibilité qui semble accrue dans les régions de nature dopaminergique appartenant à des circuits limbiques impliqués dans la gestion des émotions et le circuit de récompense.

2. Effets de polluants environnementaux sur le comportement

D'un point de vue comportemental, des études montrent que l'exposition prénatale à des particules diesel modifie à long terme différents aspects du comportement chez la souris. Yokota et collaborateurs ont ainsi montré que la descendance de souris gestantes exposées 8h/jour de GD2 à GD17 à ce type de particules présentes une augmentation de l'agressivité à l'âge adulte (Yokota *et al.*, 2016). Cependant, les effets sur les fonctions cognitives ne sont pas toujours observés à l'âge adulte après une exposition prénatale chez la souris (Hougaard *et al.*, 2008).

Chez le lapin nos résultats sembleraient aller dans le sens d'une disparition à l'âge adulte des effets observés très tôt au niveau du développement. En effet des résultats préliminaires du laboratoire montrent que des jeunes lapins (PND2) issus de mères exposées aux PFD présentent une baisse de la réponse à la présentation d'une phéromone mammaire (le 2-NBT) par rapport aux animaux témoins. Ce trouble comportemental n'est plus observé chez le lapin adulte dans un test de discrimination olfactive dit de la boule à thé (Bernal Melendez *et al.*, 2019).

L'absence d'effet suite à une exposition aux PFD chez le lapin devenu adulte pourrait mettre en évidence une clairance des polluants et donc une réversibilité des effets.

Une autre hypothèse est envisageable et elle concerne les neurones sensoriels olfactifs. Crews & Hunte expliquaient en 1994 que l'intégrité du tissu épithélial est maintenue par un renouvellement continu des cellules olfactives, dont la durée de vie varie entre 30 et

120 jours (Crews & Hunter., 1994). Par conséquent, au sein de l'épithélium cohabitent des neurones matures et immatures. Il est donc possible que le renouvellement épithélial nasal explique la disparition des effets observés chez les fœtus.

À noter que le modèle lapin n'est pas le meilleur modèle d'étude pour des tests comportementaux, à l'exception de tests de reconnaissance olfactive du fait de son comportement naturel qui est grégaire et peu caractérisé.

3. Effets de polluants environnementaux sur la neurochimie

D'un point de vue neurochimique, l'exposition à des particules diesel de souris gestantes et/ou allaitantes entraîne soit des diminutions soit des augmentations des concentrations extracellulaires de neurotransmetteurs (dopamine, sérotonine et noradrénaline) au stade juvénile ou adulte (Allen *et al.*, 2014 a et b).

Dans notre laboratoire, des études par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ont montré chez les fœtus GD28 ainsi que chez l'adulte une diminution de la sérotonine et une augmentation de la dopamine et de ses métabolites dans le bulbe olfactif de lapin (Bernal Melendez *et al.*, 2019).

Ces résultats ont été en partie confirmés par des études immunohistochimiques réalisées chez des fœtus GD28 montrant une augmentation de l'intensité du marquage de la tyrosine hydroxylase, enzyme de synthèse de la dopamine dans les cellules périglomérulaires du bulbe olfactif et les neurones dopaminergiques de différentes régions centrales comme la substance noire ou l'aire tegmentale ventrale.

Cette augmentation d'intensité caractérise une augmentation de la synthèse de dopamine au niveau cellulaire et non une augmentation du nombre de cellules dopaminergiques synthétisant la dopamine (Bernal Melendez *et al.*, 2019). L'ensemble des résultats montre des altérations métaboliques des cellules périglomérulaires dopaminergiques. La question qui se pose désormais est de savoir si ces altérations sont inhérentes à ces cellules monoaminergiques, ou si c'est le reflet d'une dérégulation générale de l'activité neuronale au niveau bulbaire. Afin de vérifier ces hypothèses, des marquages à la cytochrome oxydase au niveau de ces structures ont été réalisés aux deux stades d'intérêt. Malheureusement, l'activité de la cytochrome oxydase mesurée au stade fœtal étant faible du fait de l'immaturation du cerveau à ce stade et de l'absence de stimulation significative de

l'activité cérébrale, les mesures n'ont pu être réalisées que sur deux structures dopaminergiques facilement localisables qui sont l'aire tegmentale ventrale et la substance noire. Les résultats n'ont pas montré de différence de l'activité de l'enzyme dans ces deux structures entre les deux groupes d'animaux (Bernal Melendez *et al.*, 2019).

Concernant la modulation sérotoninergique, seules des terminaisons axoniques sont présentes au niveau du bulbe olfactif. Il est possible que l'exposition périnatale, diminuant le nombre de synapses ait de ce fait diminué le taux de sérotonine. Ces deux effets ont été retrouvés à l'âge adulte.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats obtenus chez l'adulte lors de mon travail de thèse montrent que l'exposition gestationnelle aux particules de diesel induit des modifications fonctionnelles cérébrales à long terme avec une sensibilité particulière du système dopaminergique, plus particulièrement au niveau des structures limbiques appartenant à la voie mésocorticolimbique. Cette précision nous étant apportée par l'analyse immunohistochimique via la tyrosine hydroxylase qui montre un accroissement significatif de l'intensité du marquage dans l'aire tegmentale ventrale chez les animaux exposés tandis qu'aucune autre différence n'est à relever dans les autres régions dopaminergiques étudiées (substance noire, striatum et cortex préfrontal). Il est à noter que cette analyse a été mise en place après mon passage au laboratoire en s'aidant des découvertes faites en cytochrome oxydase et acétylcholinestérase. Désormais, appuyons-nous sur l'ensemble des données obtenus lors du projet BrainAirPoll afin d'envisager les perspectives à venir vis-à-vis des PFD.

4. Variations sexe-dépendantes suite à l'exposition gestationnelle aux PFD

Des données épidémiologiques et expérimentales récentes ont démontré que les deux sexes pouvaient présenter des métabolismes différents (concernant l'assimilation ou l'élimination d'une substance par exemple) et/ou pouvaient être sujets à diverses maladies à des fréquences différentes (par exemple, dans le cas des troubles du spectre autistique, ces troubles sont cinq fois plus fréquents chez les garçons que chez les filles (Baio., 2014). Par conséquent, le sexe est devenu une variable à prendre en considération dans tous les systèmes étudiés.

Ainsi, il a été décidé dans ce projet, de tenir compte de l'impact du sexe dans les diverses expériences effectuées.

Les analyses neurochimiques et histologiques ont montré des altérations sexe-dépendantes au niveau de plusieurs structures d'intérêts que ce soit au stade fœtal GD28 qu'au stade adulte PND216. Ces données suggèrent donc que l'exposition gestationnelle aux PFD entraînerait des effets sexe-dépendants. Dans la littérature, de tels effets ont déjà été évoqués. Bolton et collaborateurs (2013) ont par exemple observé que seules les souris mâles issues des mères exposées à la pollution atmosphérique et à un stress maternel présentent des déficits de mémoire dans un test de conditionnement de peur contextuel à l'âge adulte, ainsi qu'une augmentation des niveaux d'interleukine IL-1 β centrale. Une autre étude met en évidence ce type d'effet, celle d'Allen et Collaborateurs en 2014. Ils ont montré chez des animaux issus de souris exposées aux PFD des comportementaux différents en fonction du sexe et du stade de développement considéré. Ils ont notamment observé une augmentation de niveaux de dopamine dans la zone du cortex préfrontal et du mésencéphale chez les souris mâles alors que les souris femelles présentent une augmentation du turnover de la dopamine dans le cortex préfrontal, mais une diminution du turnover dans le mésencéphale (Allen et al, 2014b). On peut donc envisager que les altérations monoaminergiques ainsi que leurs potentielles régulations varient en fonction du sexe de l'animal.

Malgré le fait que l'ensemble de nos résultats laisse aussi supposer que l'exposition gestationnelle aux PFD entraîne des effets neurochimiques sexe-dépendants au stade fœtal et adulte, l'interprétation de ceux-ci reste incomplète et ne nous permet pas de conclure sur des effets plus intenses chez les mâles ou les femelles, du fait de l'absence de données au stade fœtal et de variations complexes exposées ici aux stades fœtal et adulte.

5. Pertinence et limitations de l'étude

5.1. Choix du modèle lapin

Initialement le lapin a été choisi pour la structure hémochoriale de son placenta, proche de celle de la femme, ainsi que pour sa période intergénérationnelle courte et la taille de son embryon. Cependant, le choix de cet animal peut engendrer plusieurs inconvénients, notamment pour l'étude du cerveau.

D'abord, la longueur de la gestation, qui est seulement de 31 jours comparés aux 9 mois dans l'espèce humaine. Par conséquent, il est possible que les mécanismes d'adaptation des circuits neuronaux en réponse à une exposition gestationnelle répétée suivent une cinétique différente et utilisent des mécanismes différents.

Autre inconvénient, la taille de la portée. Chez la lapine elle est de 7 à 12 lapereaux tandis qu'une femme a 1 voire 2 enfant. Dès lors l'environnement et les ressources sont partagés entre les différents lapereaux. Ce partage peut avoir un effet sur le développement du fœtus et s'avère donc dépendant de la position de celui-ci (Chavatte-Palmer *et al.*, 2008). Il est donc important de prendre en considération non seulement la portée, mais également la position du fœtus dans la corne utérine dans les analyses statistiques, ce qui n'a pas été fait ici.

5.2. L'exposition « nose-only », la meilleure alternative pour s'approcher des conditions humaines

L'utilisation des tubes de contention dans cette étude a permis une exposition nasale totale des animaux afin de contrôler le niveau d'exposition de ceux-ci tout au long de l'étude. D'autres études retrouvées dans la littérature optent pour des chambres d'inhalation, mais dans ce cas les animaux sont exposés entièrement. Les particules peuvent alors se mettre sur le pelage de l'animal et être possiblement ingérées lors du toilettage. Elles peuvent ensuite passer l'épithélium intestinal et atteindre n'importe quel organe y compris le cerveau par une voie qui n'est plus l'inhalation.

Autre avantage de ce modèle d'exposition, le calibrage des particules présentes dans les gaz d'échappement de notre expérimentation. Elles sont proches de celles rejetées par les automobiles diesel ce qui tend vers des conditions d'exposition réelles humaines vivant en milieu urbain.

Toutefois quelques limites persistent avec ce type d'exposition. Tout d'abord, l'exposition aux gaz d'échappement de moteur diesel seuls n'est pas véritablement représentative d'une exposition humaine. Certes les gaz d'échappement sont la source principale de pollution, mais d'autres sources produisent des particules dans notre environnement comme l'industrie ou l'agriculture. Ensuite le moteur diesel (25KVA) utilisé au cours de nos expérimentations est moins récent que les moteurs diesel de la majorité du parc automobile diesel actuel. À cela, s'ajoute le fait que le fonctionnement du moteur est constant et stationnaire comparé aux accélérations et ralentissement du moteur d'un véhicule en action. Cette constance permet la reproductibilité des paramètres pour une exposition chronique (MAPCEL, RIVM). Ce moteur émet probablement plus d'HAP et de résidus d'huile que les moteurs diesel récents. La technologie des moteurs diesel évolue sans cesse afin de limiter les émissions polluantes, les filtres sont de plus en plus performants ce qui induit une émission de particules plus fines que celles émises par le moteur de notre étude.

Les moteurs récents sont alors peut-être « moins polluants » en termes de quantité d'émissions, mais ils produiraient plus de particules ultrafines. Or les particules les plus fines sont celles qui pénètrent le plus profondément l'organisme et possèdent la toxicité la plus importante. Par conséquent la composition des gaz d'échappement peut varier légèrement d'un moteur à l'autre. Le type, la puissance et le fonctionnement du moteur diesel sont donc un autre élément à prendre en compte dans la comparaison des études des effets de l'inhalation des gaz d'échappement sur la santé.

Enfin, la nature chimique des particules inhalées par les lapines durant la gestation n'a pas été étudiée. Or il a été démontré que la composition de la couronne des particules était impliquée dans les potentiels mécanismes de transfert et de réactivité dans les tissus biologiques (Ali *et al.*, 2015 ; Docter *et al.*, 2015 ; Ruiz *et al.*, 2015). Il serait donc intéressant de caractériser les particules afin d'envisager les mécanismes d'action mis en place par celles-ci dans l'organisme des lapines.

5.3. Les PFD ne semblent pas être la seule source aux effets neurodéveloppementaux observés

Comme expliqué auparavant la période prénatale est une fenêtre déterminante pour le neurodéveloppement cérébral du fœtus. Durant celle-ci, la croissance fœtale est en grande partie dépendante des signaux physiologiques maternels délivrés *via* le placenta (Fatima *et al.*, 2017). Ainsi, le stress maternel peut conduire à des dysfonctionnements cognitifs, comportementaux et émotionnels, comme les troubles du spectre autistique et les troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité (King et Laplante., 2005 ; Laplante *et al.*, 2007, 2008).

Dès lors, il est possible d'envisager que les effets observés durant notre étude ne sont pas forcément dus qu'aux PFD et que d'autres facteurs environnementaux comme le stress induit par la mise en contention des animaux ont leur importance dans nos résultats. Les travaux de Bolton et collaborateurs (2013) ont démontré qu'un stress maternel survenant en fin de gestation augmente la sensibilité de la descendance aux effets de l'exposition prénatale aux PFD. Une « synergie » est donc envisageable, entre ces facteurs, sur le développement cérébral, via une modification du comportement de soin maternel par exemple.

Lors de notre expérimentation, des tests préliminaires ont été mis en place afin d'obtenir des conditions optimales d'exposition limitant le stress des lapines. Ces manipulations ont permis d'établir le temps d'exposition optimal (une heure, deux fois par jour) et ont montré le besoin d'habituer les lapines à entrer et rester dans les dispositifs d'exposition.

Toutefois, seule une comparaison avec un lot de lapines non manipulées et non mises en contention aurait permis d'évaluer l'absence d'effet de la contention sur la physiologie maternelle, et par extension d'exclure une présensibilisation maternelle aux effets de l'exposition aux PFD sur les descendants au stade foetal.

D'après Valentino et collaborateurs, aucun effet significatif de la contention n'a été observé dans la phase initiale de ce projet de recherche. L'ensemble des paramètres étudiés n'a montré aucune différence entre les groupes, que ce soit sur la température corporelle ou le taux de cortisol (considérés comme marqueurs de stress maternel), la biochimie sanguine ou la biométrie des organes des lapines gestantes (Valentino *et al.*, 2016b). Aussi, le pourcentage et la durée de gestation, la taille des portées et le sex-ratio n'ont pas relevé de différence entre les deux groupes. Ces résultats révèlent que la contention obligatoire due au dispositif n'a pas eu d'impact majeur sur l'état physiologique général maternel ni sur le déroulement de la gestation.

6. Rapport final sur le projet BrainAirPoll

Les résultats actuels du programme BrainAirPoll montrent qu'une exposition gestationnelle aux particules de fumées de diesel induit à court terme des altérations anatomofonctionnelles des capacités olfactives ainsi que de l'activité fonctionnelle cérébrale dans certaines régions du cerveau, préférentiellement de nature dopaminergique. Des répercussions plus localisées au niveau central que de la fonction olfactive sont observées à l'âge adulte et pourraient être indicatrices de l'émergence de possibles troubles neurodégénératifs et cognitifs à long terme. Ces résultats suggèrent aussi que les atteintes olfactives observées précocement pourraient être indicatives de la mise en place d'une neurotoxicité à plus long terme, la muqueuse et le bulbe olfactif constituant une interface directe entre l'environnement et le cerveau. Enfin, des effets potentiels de l'exposition aux particules diesel sur la fonction olfactive de la génération F2 sont observés indiquant la capacité de ce type d'exposition foetale à induire des effets intergénérationnels sur le développement de la fonctionnalité cérébrale possiblement au niveau de deux générations successives.

Les résultats des analyses du transcriptome et du protéome au niveau olfactif et central qui sont en cours de traitement permettront d'identifier des pistes quant aux mécanismes impliqués dans la génération de ces effets neurotoxiques à court et à long terme. De même, la sensibilité différentielle des mâles et des femelles à l'exposition indirecte aux particules de

diesel dans différentes zones du cerveau qui a été observée reste à préciser et les mécanismes potentiels à explorer.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude illustre les effets toxiques neurodéveloppementaux d'une exposition gestationnelle nasale quotidienne et contrôlée aux PFD, sur un modèle animal de placentation hémochoriale humaine, et dans des conditions imitant l'exposition humaine en milieu urbain. Via une approche complète regroupant de la microscopie électronique, de l'immunohistochimie, de la neurochimie, associée à des approches comportementales et neurofonctionnelles, elle contribue à donner des éléments quant aux mécanismes responsables des effets sur différentes zones du cerveau. L'ensemble des résultats obtenus initialement au stade fœtal, tant au niveau olfactif que central, montre que l'exposition aux fumées de diesel a un impact sur l'intégrité des structures cérébrales des animaux à une période critique de leur développement. Dès lors elle pourrait mener à des altérations majeures du neurodéveloppement du fœtus avec des conséquences chez l'adulte.

Ces données rejoignent la littérature actuelle, qui évoque que l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique interagit avec le développement du cerveau du fœtus et pourrait à terme prédisposer l'individu à des maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives (Heusinkveld *et al.*, 2016). En effet, des données épidémiologiques récentes ont démontré qu'une exposition à ce stade de développement pouvait être corrélée avec l'émergence de troubles neurodéveloppementaux, comme les troubles du spectre autistique et les troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité chez l'homme (Guxens *et al.*, 2012, 2014 ; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2016). Les données expérimentales, elles, ont montré des altérations structurales et moléculaires des tissus neuronaux, pouvant provoquer des troubles neurocomportementaux chez l'adulte (Bolton *et al.*, 2013 ; Allen *et al.*, 2014 ; Hougaard *et al.*, 2015 ; Wong *et al.*, 2015). Des déséquilibres des systèmes monoaminergiques liés à divers troubles neurocognitifs ont aussi été observés (Yokota *et al.*, 2009, 2013, 2016).

Du fait de la continuité anatomofonctionnelle entre le système olfactif et le cerveau, les résultats obtenus ont montré des désordres de la neurotransmission dans les structures antérieures cérébrales. Ces altérations suggèrent la présence de particules dans le liquide amniotique conduisant à les retrouver dans les structures olfactives fœtales. La présence physique des particules conduirait alors à des dérégulations de l'homéostasie cellulaire et à une dénervation des afférences sérotoninergiques au niveau des structures cérébrales antérieures, ce qui engendrerait une réponse plastique compensatoire. Malgré les limites dues au modèle et aux techniques utilisées, nos travaux permettent d'entrevoir plusieurs

perspectives. Tout d'abord nous avons montré différentes voies d'entrée vers le système nerveux fœtal, utilisées par les particules fines de diesel. Il serait intéressant de déterminer selon quelle cinétique se fait la distribution des particules au niveau cérébral, et par quel mécanisme d'internalisation. Il serait aussi judicieux d'étudier d'autres compartiments (foie, plasma ...).

De plus, le prélèvement et l'analyse d'autres tissus (poumon, placenta) et matrices biologiques (urine, lait et sang maternels, sang des jeunes) pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes de transfert, distribution et « métabolisme » des PFD chez fœtus et par extension chez l'adulte.

Concernant les mécanismes mis en jeu dans les atteintes cérébrales, il serait intéressant de suivre l'effet de l'exposition aux particules diesel sur la dynamique des tissus olfactifs, MO et BO, qui constituent des modèles très intéressants de la régénération, du fait qu'ils contiennent pour l'un, des cellules souches et pour l'autre, des précurseurs neuronaux. La possibilité de suivre cette dynamique *in vivo* par incorporation de traceurs fluorescents intranasaux, mais aussi *in vitro* en culture primaire, permettrait d'étudier les mécanismes cellulaires de plasticité neuronale et d'extrapoler ces résultats aux neurones du SNC et aux niches neurogéniques qu'il contient.

Concernant les conséquences comportementales que nous avons identifiées, il faudrait disposer de nouveaux individus pour réaliser *in vivo* des mesures électrophysiologiques de la réponse olfactive, par électro-olfactogramme par exemple, caractériser les réseaux de neurones affectés en réponse à la phéromone mammaire et suivre l'évolution de la modulation de la réponse aux odeurs en développant d'autres tests olfactifs permettant de mieux mesurer l'identification, la discrimination et le seuil de sensibilité olfactive des animaux exposés. De plus, une évaluation régulière et plus tardive des animaux adultes permettrait de déterminer si les effets comportementaux observés évoluent et persistent dans le temps, auquel cas, il serait possible de poser la question de l'influence de cette exposition dans l'apparition de maladies neurodégénératives.

La mise en place au niveau régional d'un indicateur de l'activité fonctionnelle cérébrale comme celui de la cytochrome oxydase permettrait de déterminer la sensibilité aux PFD des régions du cerveau impliquées dans la régulation de divers comportements, comme cela a déjà été montré (Crépeaux *et al.*, 2012, 2013 ; Peiffer *et al.*, 2011) et ainsi fournir des premiers éléments de réponse quant à la sensibilité du cerveau à la présence du polluant et au mécanisme d'action possible de ce dernier (toxicité physique, gazeuse,...). Ce travail ayant confirmé le risque de l'exposition par inhalation aux PFD à des niveaux d'exposition

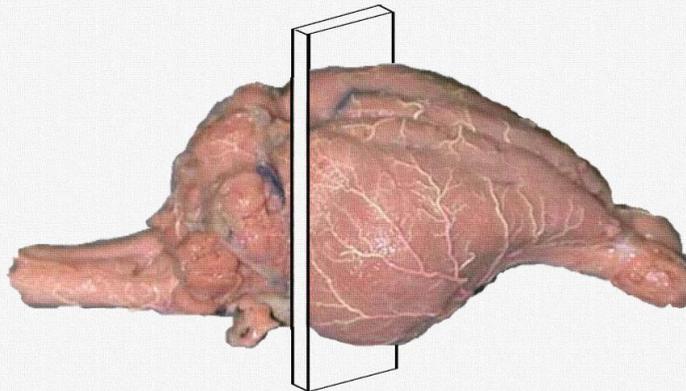
représentatifs de la population humaine urbaine, il constitue un argument pouvant motiver la réalisation d'autres travaux visant à évaluer les effets de l'inhalation d'autres types de polluants (des gaz tels que les NOx ou l'ozone) ou d'autres familles de polluants (tels que les HAP). Ceci permettrait d'appréhender les différences ou les potentiels effets synergiques existant entre l'exposition à des particules seules (ou majoritairement) et des mélanges de polluants atmosphériques, pour ainsi établir la nature et l'importance des effets susceptibles d'être induits à des niveaux environnementaux d'exposition par les deux voies d'entrées principales de la contamination.

Enfin, la mise en place d'une cartographie plus complète des dérégulations des systèmes neurotransmission cérébrale permettant de compléter celle de la cytochrome oxydase aiderait à déterminer et confirmer dans un premier temps la sensibilité aux PFD des régions du cerveau impliquées dans la régulation de multiples neuromodulateurs et des comportements auxquels ils sont associés, et dans un second temps confirmer l'hypothèse d'une régulation compensatoire entre les divers systèmes.

En conclusion, ces travaux offrent des pistes de compréhension sur l'étiologie de certains troubles observés dans les populations humaines en lien avec l'environnement extérieur, en montrant des atteintes du fonctionnement cérébral suite à une exposition gestationnelle. Ils alertent également sur la nocivité des gaz d'échappement chez la femme enceinte et le fœtus en développement. Cependant, les mécanismes précis d'action de ces nanoparticules diesel restent encore à approfondir. Ils s'inscrivent pleinement dans les programmes des agences françaises qui visent à comprendre les impacts de la qualité de l'air sur la santé, puisqu'ils apportent des arguments scientifiques sur les risques encourus lors d'une exposition aux particules environnementales au cours de cette période critique qu'est la fin de grossesse. Tout comme pour l'enfant ou la personne âgée, la femme enceinte doit donc être considérée comme une personne vulnérable, non seulement à titre personnel, mais aussi au regard de sa future progéniture. Le niveau d'exposition aux contaminants présents dans l'air extérieur auquel elle doit être exposée doit donc être minimisé autant que possible. Des solutions de protection individuelle étant peu envisageables, la prévention reste la meilleure alternative.

ATLAS DE L'ENCÉPHALE DE LAPIN ADULTE

Grégoire MENCARELLI, Benoit OLIVIER, Estefania BERNAL MELENDEZ, Henri SCHROEDER,
Pascaline BOUILLAUD
Equipe Composés Alimentaires : Biofonctionnalités et Risques Neurotoxiques, 54506 Vandœuvre-Lès-Nancy



Abréviations

3N= Noyau moteur du nerf oculomoteur
7= nerf facial
4V= 4ème ventricule
AcbC = noyau accumbens (cœur)
AcbSh = noyau accumbens (ceinture)
AHA = aire hypophysalaire antérieure
Au = aire auditive
B = Noyau basal de Meynert
BLA = Noyau basolatéral de l'amygdale
BMA = noyau basomédian de l'amygdale
CA1 = corne d'Ammon, zone 1
CA2 = corne d'Ammon, zone 2
CA3 = corne d'Ammon, zone 3
Cd = noyau caudé
CeA = noyau central de l'amygdale
Cg = cortex cingulaire
CGL = corps géniculé latéral
CGM = corps géniculé médian
CGV = corps géniculé ventral
Cl = claustrum
Collnf = colliculus inférieur
ColSup = colliculus supérieur
DG = gyrus denté
DHip = hippocampe dorsal
DL = noyau dorsolatéral du thalamus
DMH = noyau dorsomédian de l'hypothalamus
DTg = noyau temental dorsal
DTgP = noyau tegmental dorsal (partie postérieure)
Ent = cortex entorhinal

fi = fimbria
GP = globus pallidus
GrCb = couche granulaire du cortex cérébelleux
Int = noyau interposé du cervelet
L = noyau latéral du thalamus
Lat = noyau lateral (dentelé) du cervelet
LatA = noyau lateral de l'amygdale
LC = locus coeruleus
LDTg = noyau tegmental latérodorsal
LSD = septum lateral (partie dorsale)
M = cortex moteur
mcp = pédoncule cérébelleux moyen
Me5 = noyau trigéminale mésencéphalique
MeA = noyau median de l'amygdale
Med = noyau median du thalamus
MoCb = couche moléculaire du cortex cérébelleux
MS = septum médian
PAG = substance grise périaqueducule
PBG = noyau parabigéminale
PH = hypothalamus postérieur
Pir = cortex piriforme
Pk = couche des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux
PL = noyau postérolatéral du thalamus
Pn = noyaux du pont
PrL = cortex prélimbique
PTg = noyau tegmental pédonculo-pontin
Put = putamen
R = raphé
RR = Raphé rostral

Rt = noyau réticulaire du thalamus
SN = substance noire
SNC = substance noire compacte
SNR = substance noire réticulée
SO = olive supérieure
Sp5 = noyau trigéminale spinal
Sth = noyau sous-thalamique
Tu = tubercule olfactif
V = cortex visuel
Ve = noyau vestibulaire
VTg = noyau tegmental ventral
VL = noyau ventrolatéral du thalamus
VM = noyau ventromédian du thalamus
VMH = noyau ventromédian de l'hypothalamus
VP = pallidum ventral
VTA = aire tegmentale ventrale

Abréviations/figure

Figure 1

4V = 4^{ème} ventricule

7 = nerf facial

Int = noyau interposé du cervelet

Lat = noyau latéral (dentelé) du cervelet

Sp5 = noyau trigéminal spinal

Ve = noyau vestibulaire

Figure 2

4V = 4^{ème} ventricule

GrCb = couche granulaire du cortex cérébelleux

MoCb = couche moléculaire du cortex
cérébelleux

Pk = couche des cellules de Purkinje du cortex
cérébelleux

Figure 3

LC = locus coeruleus

Me5 = noyau trigéminal mésencéphalique

Pn = Noyaux du Pont

Figure 4

Collnf = colliculus inférieur

DTgP = noyau tegmental dorsal (partie
postérieure)

LDTg = noyau tegmental latérodorsal

mcp = pédoncule cérébelleux moyen

PTg = noyau tegmental pédonculo-pontin

VTg = noyau tegmental ventral

SO = olive supérieure

Figure 5

Collnf = colliculus inférieur

DTg = noyau tegmental dorsal

m5 = racine motrice du nerf trigéminal

PBG = noyau parabigéminale

Pn = noyaux du pont

PTg = noyau tegmental pédonculo-pontin

R = raphé

Figure 6

3N = Noyau moteur du nerf oculomoteur

Collnf = colliculus inférieur

ColSup = colliculus supérieur

PAG = substance grise périaqueducule

PTg = noyau tegmental pédonculo-pontin

SNC = substance noire compacte

SNR = substance noire réticulée

Figure 7

CGM = corps géniculé médian

Collnf = colliculus inférieur

ColSup = colliculus supérieur

PL = noyau postérolatéral du thalamus

SN = substance noire

RR = raphé rostral

Figure 8

CGM = corps géniculé médian

ColSup = colliculus supérieur

SNC = substance noire compacte

SNR = substance noire réticulée

V = cortex visuel

VTA = aire tegmentale ventrale

Figure 9

Au = aire auditive

CGL = corps géniculé latéral

CGV = corps géniculé ventral

DL = noyau dorsolatéral du thalamus

Ent = cortex entorhinal

L = noyau latéral du thalamus

Med = noyau médian du thalamus

VL = noyau ventrolatéral du thalamus

VM = noyau ventromédian du thalamus

Figure 10

Au = aire auditive

CA1 = corne d'Ammon, zone 1

CA2 = corne d'Ammon, zone 2

CA3 = corne d'Ammon, zone 3

CGL = corps géniculé latéral

CGV = corps géniculé ventral

DG = gyrus denté

DL = noyau dorsolatéral du thalamus

fi = fimbria

L = noyau latéral du thalamus

PH = hypothalamus postérieur

Rt = noyau réticulaire du thalamus

Sth = noyau sous-thalamique

VL = noyau ventrolatéral du thalamus

Abréviations/figure

Figure 11

BLA = Noyau basolatéral de l'amygdale
BMA = noyau basomédian de l'amygdale
Cd = noyau caudé
DHip = hippocampe dorsal
DL = noyau dorsolatéral du thalamus
LatA = noyau lateral de l'amygdale
MeA = noyau median de l'amygdale
Put = putamen
Rt = noyau réticulaire du thalamus
VL = noyau ventrolatéral du thalamus

Figure 12

B = Noyau basal de Meynert
Cd = noyau caudé
CeA = noyau central de l'amygdale
DL = noyau dorsolatéral du thalamus
DMH = noyau dorsomédian de l'hypothalamus
Put = putamen
Rt = noyau réticulaire du thalamus
VMH = noyau ventromédian de l'hypothalamus

Figure 13

AHA= aire hypothalamique antérieure
Cd = noyau caudé
CeA = noyau central de l'amygdale
GP = globus pallidus
Put = putamen

Figure 14

Cd = noyau caudé
Cg = cortex cingulaire
GP = globus pallidus
M = cortex moteur
Put = putamen

Figure 15

AcbC = noyau accumbens (cœur)
AcbSh = noyau accumbens (ceinture)
Cd = noyau caudé
LSD = septum lateral (partie dorsale)
MS = septum médian
Put = putamen
VP = pallidum ventral

Figure 16

Cl= claustrum
Pir = cortex piriforme
Tu = tubercule olfactif

Figure 17

PrL = cortex prélimbique

Les différents marquages/colorations

Cytochrome oxydase

Les coupes (a) de chaque figure représentent un marquage histochimique de la cytochrome oxydase. Cette enzyme du complexe IV de la phosphorylation oxydative est un marqueur du métabolisme neuronal.

Thionine

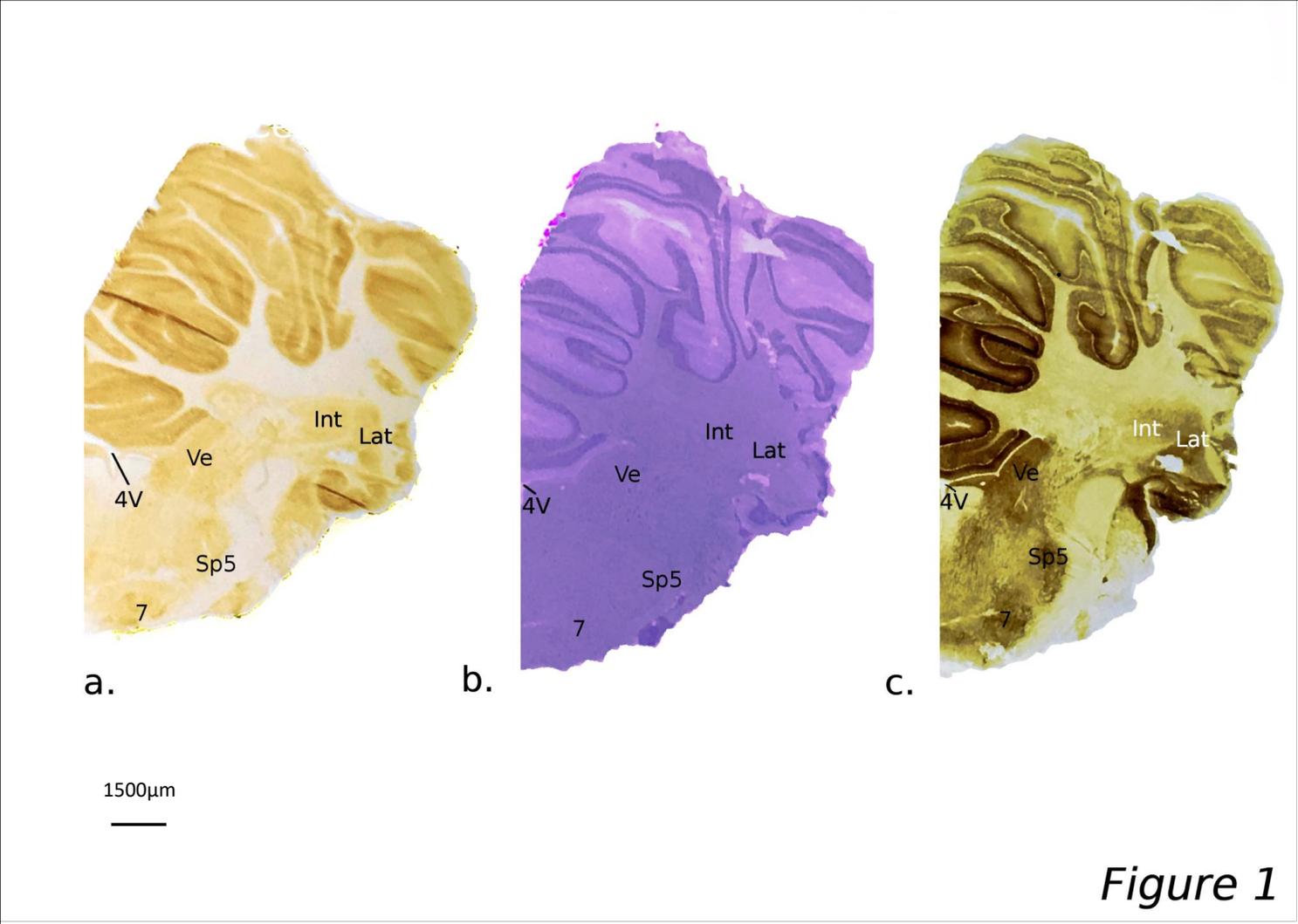
Les coupes (b) sont une coloration à la thionine, colorant basique qui marque les corps cellulaires (cytoplasme et noyau) en bleu/violet.

Acétylcholinestérase

Les coupes (c) représentent un marquage histochimique de l'acétylcholinestérase, enzyme de dégradation de l'acétylcholine, permettant de cartographier les innervations cholinergiques dans le système nerveux central

Tyrosine hydroxylase

Les coupes (d) représentent un marquage immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase, enzyme de synthèse de la dopamine (anticorps anti TH ref 1299, Sigma, 1/5000).



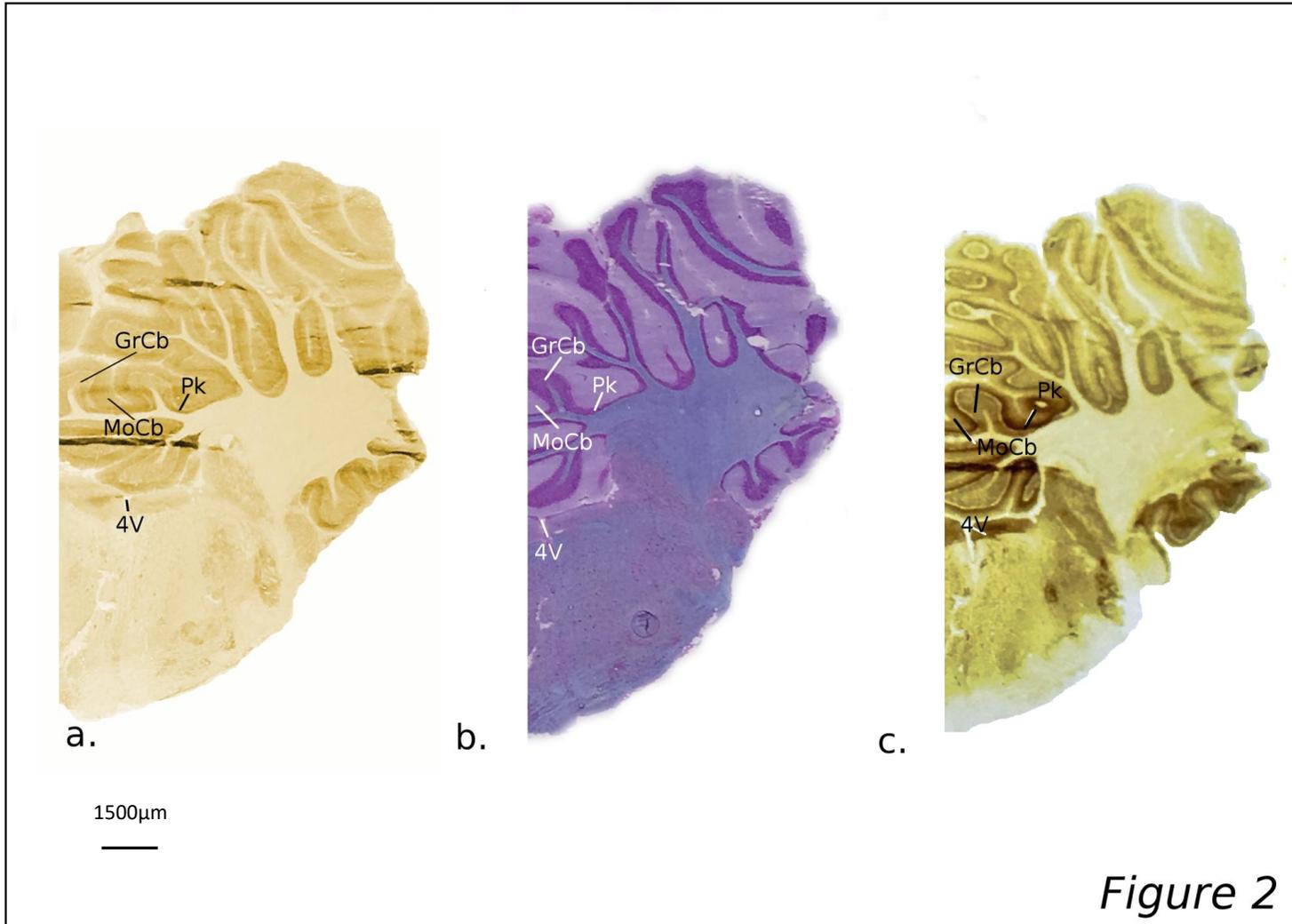
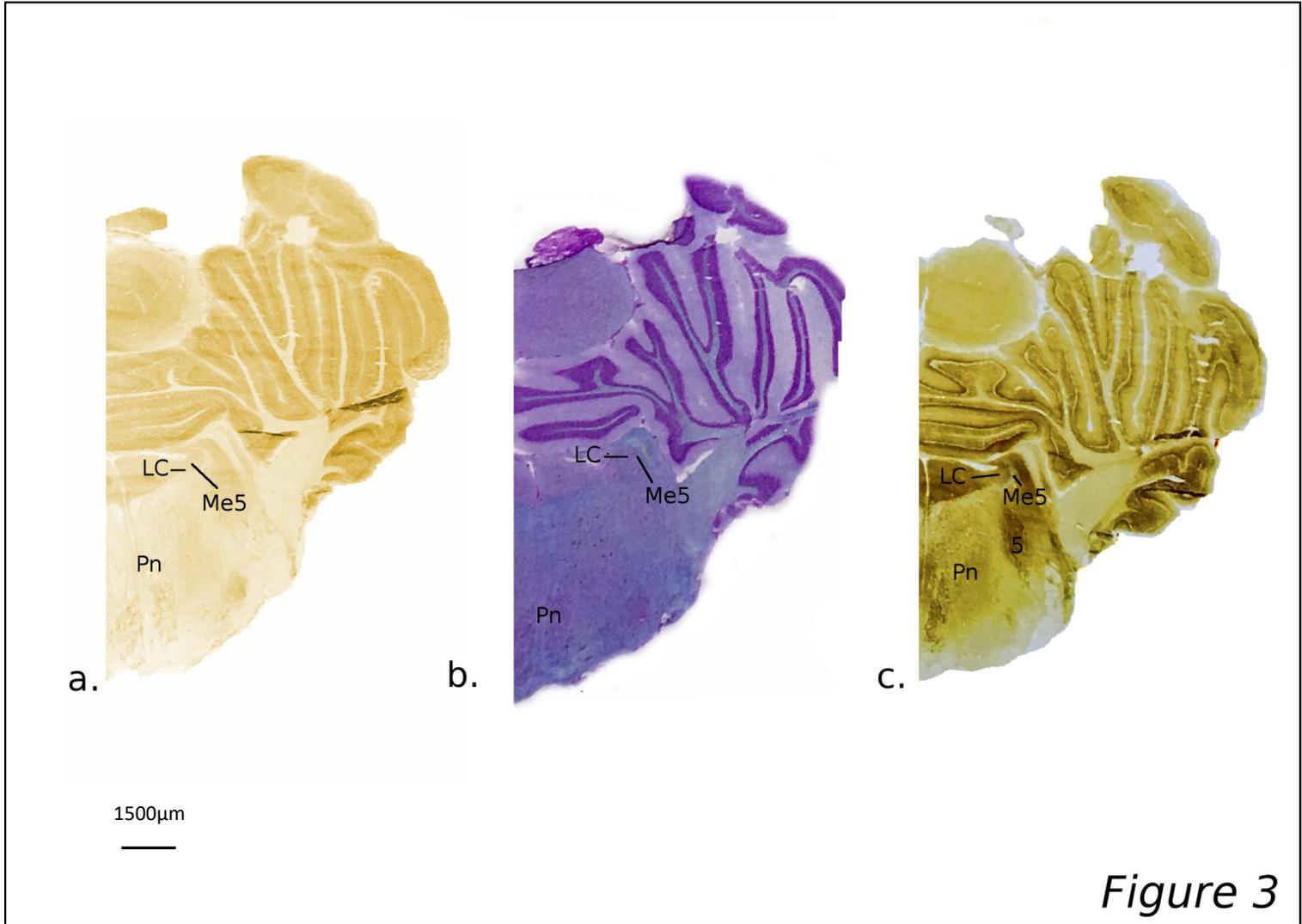


Figure 2



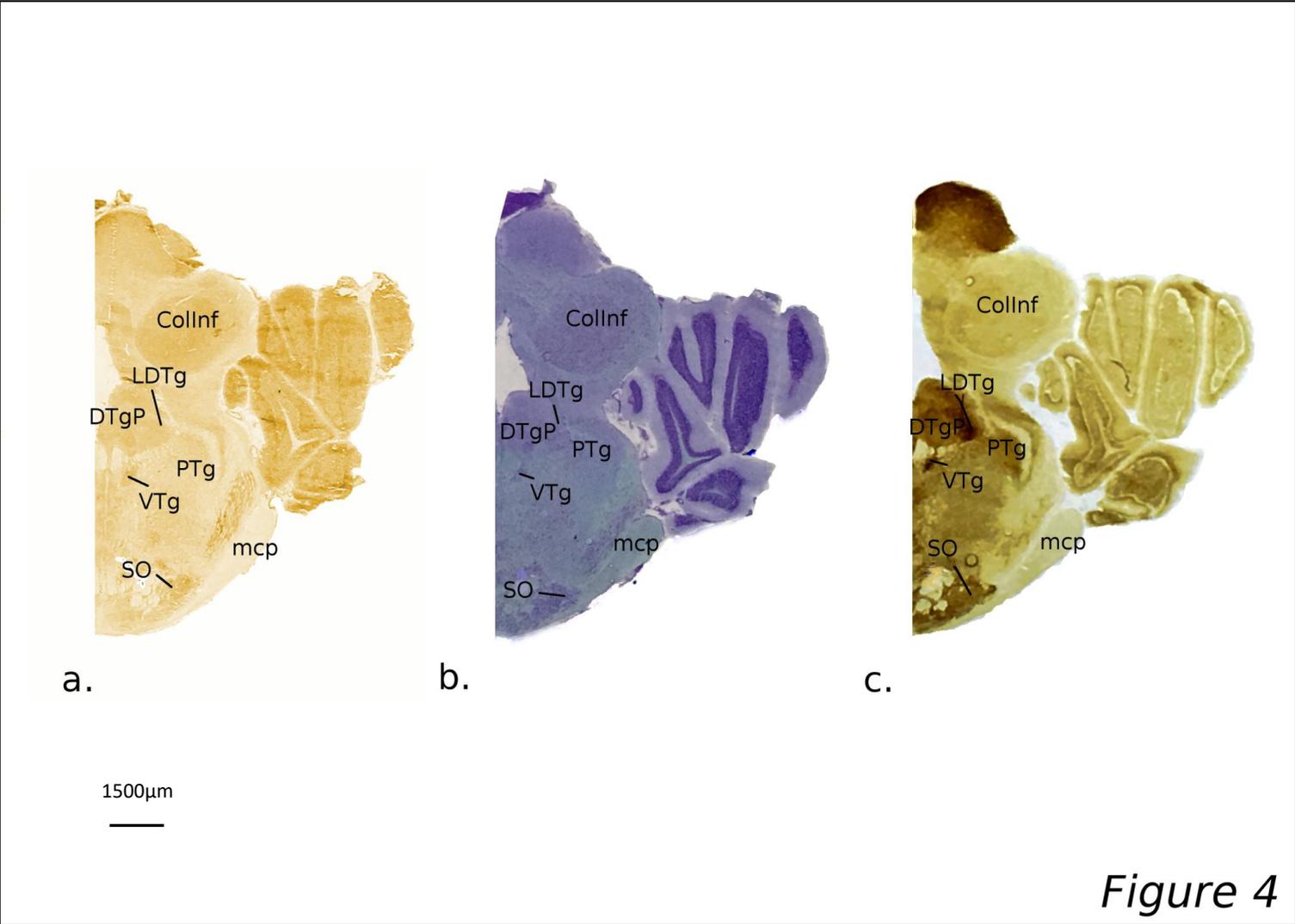
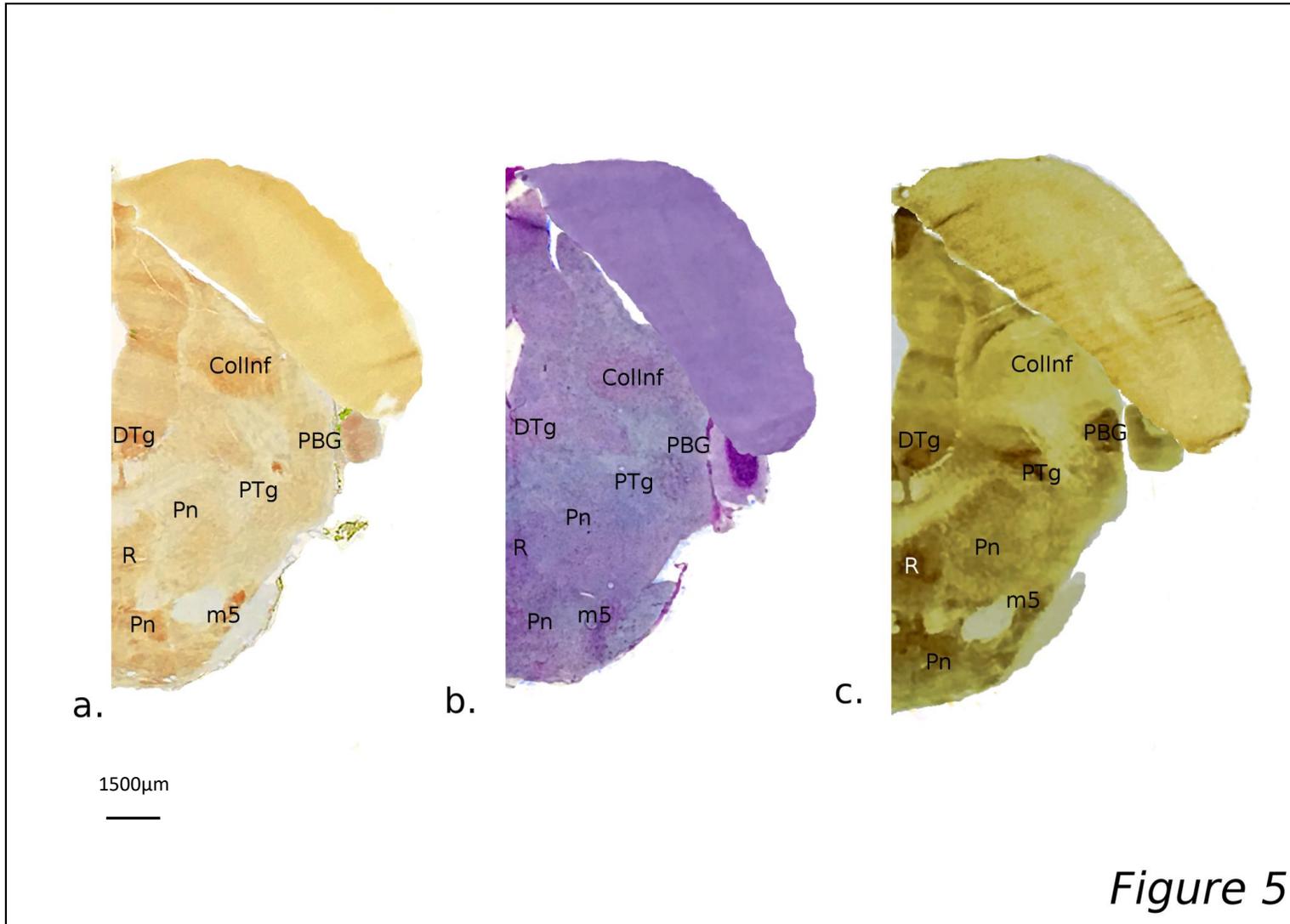


Figure 4



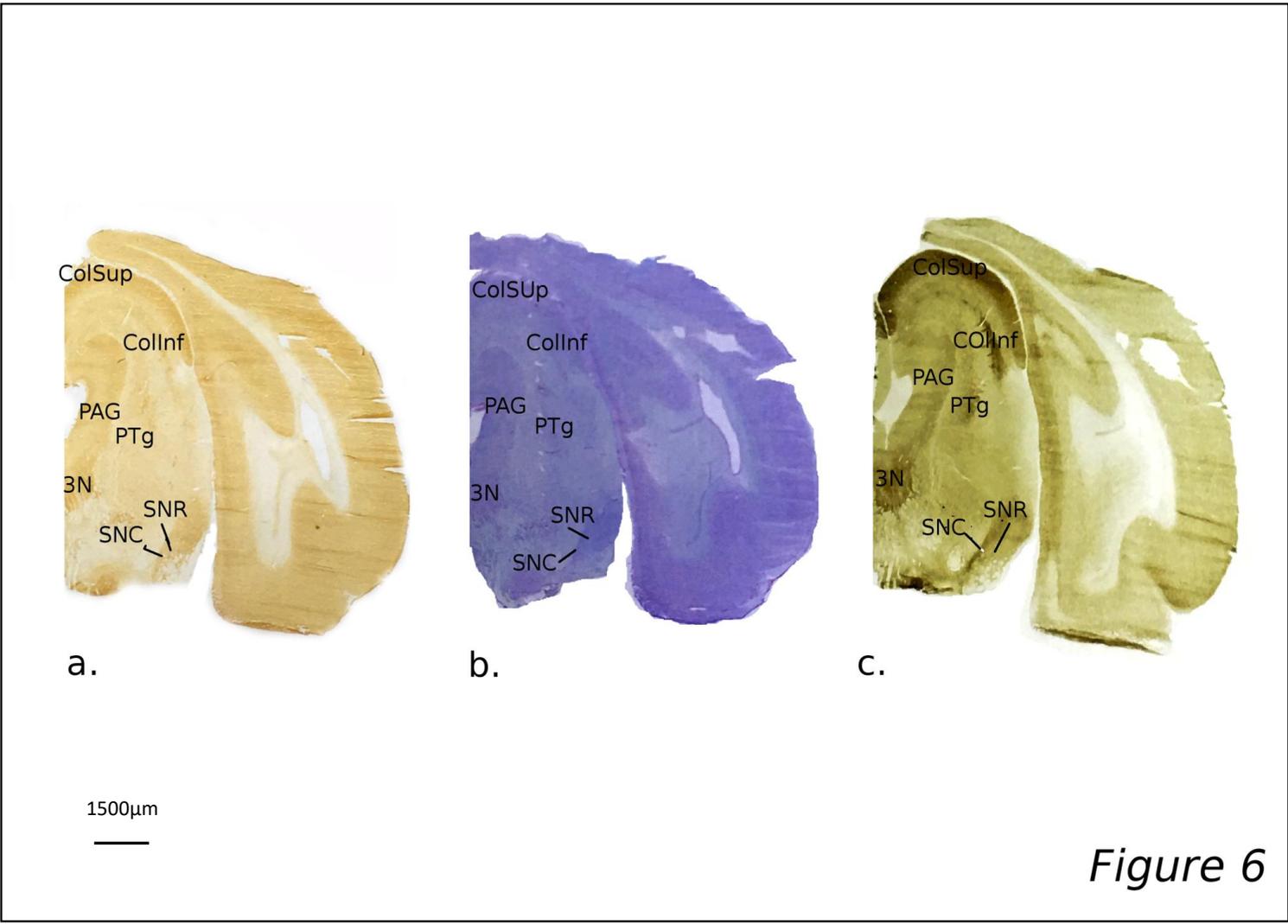
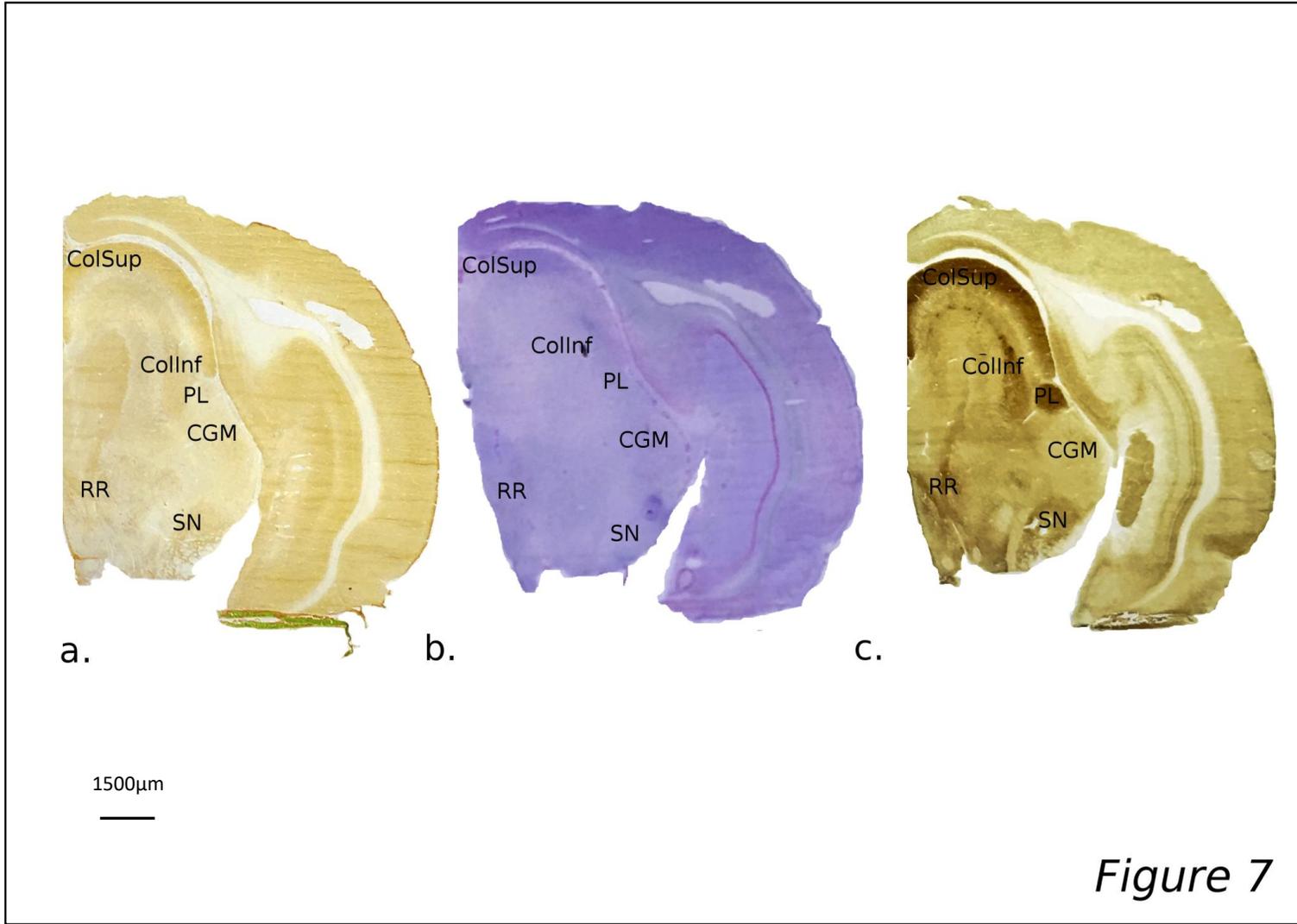


Figure 6



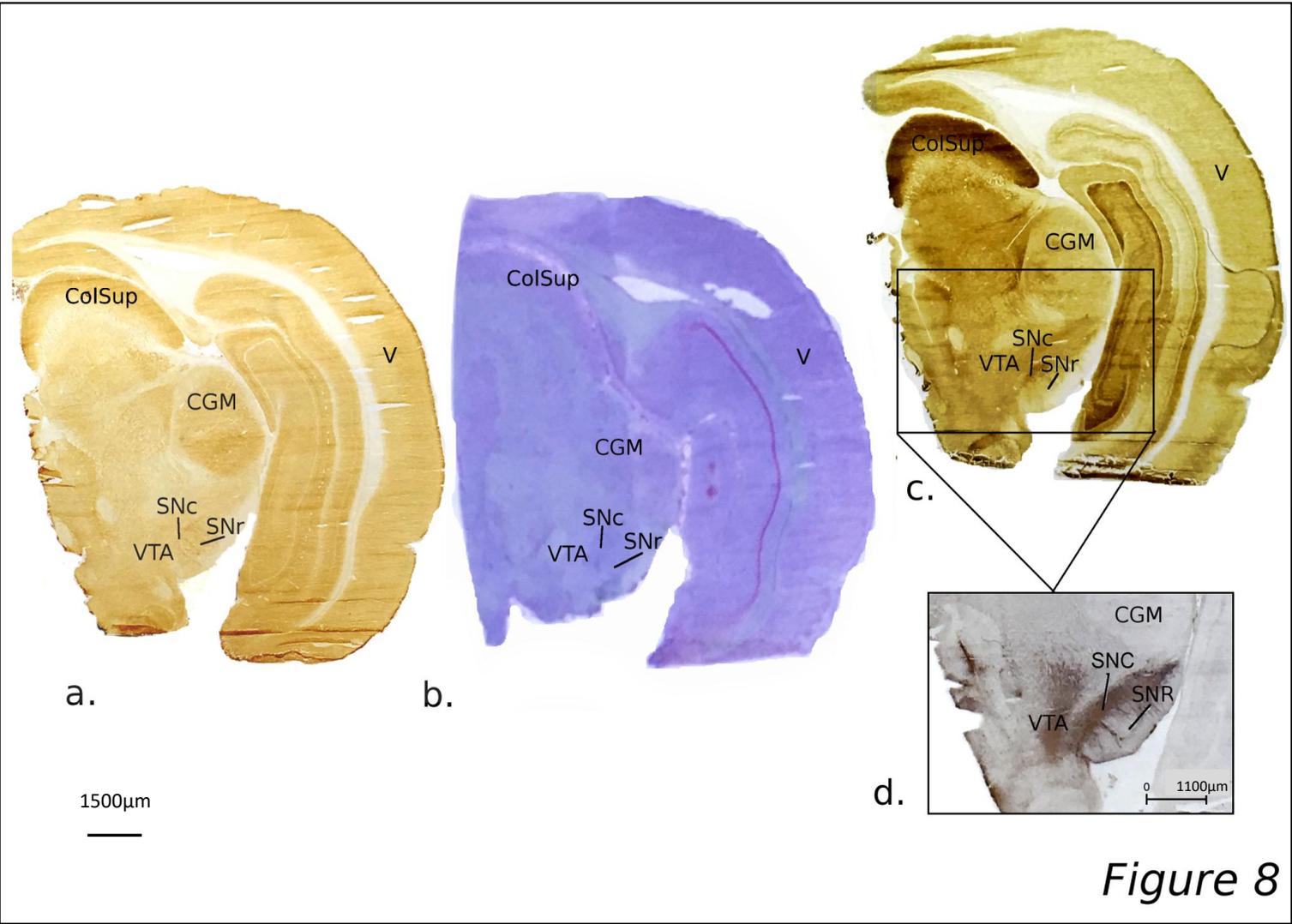
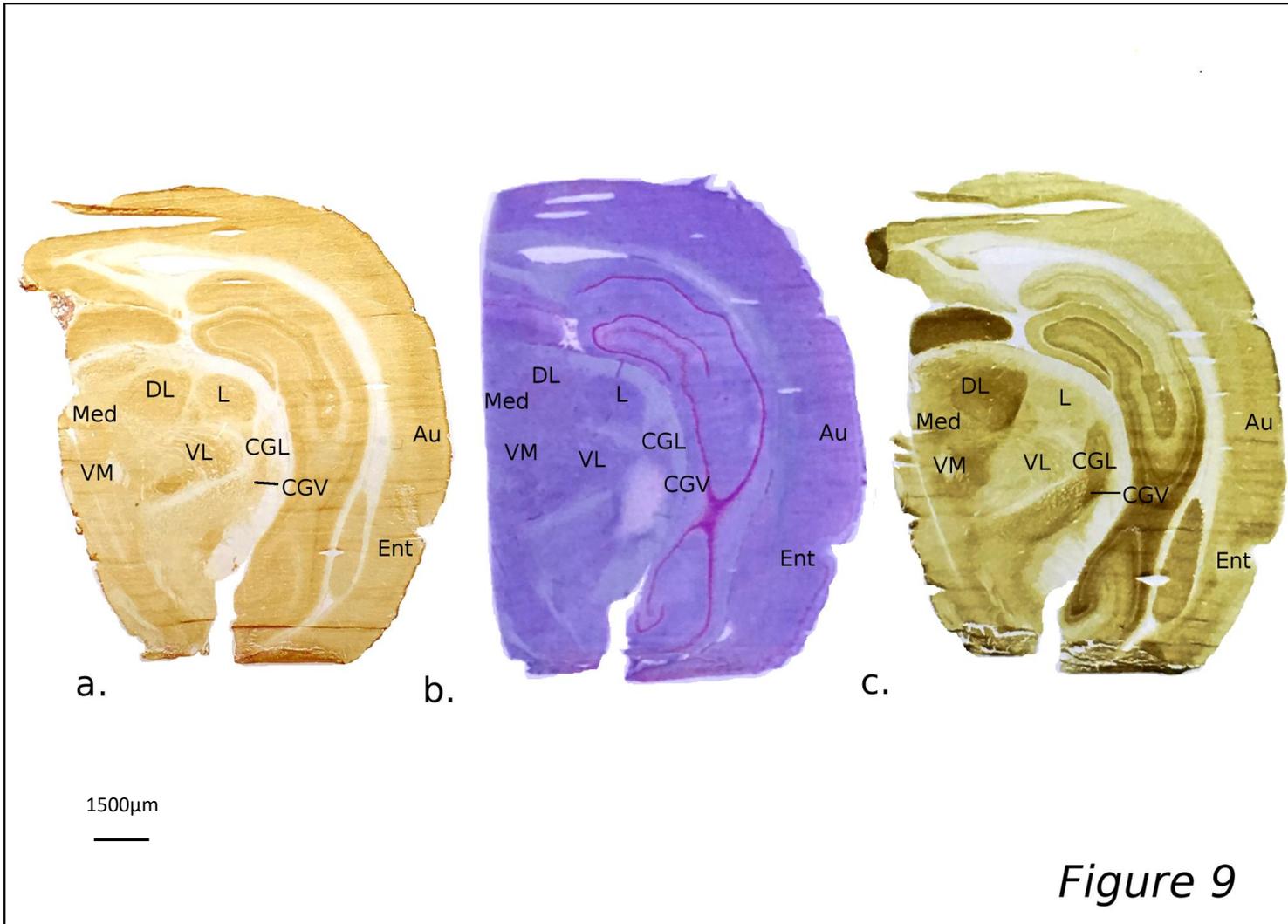


Figure 8



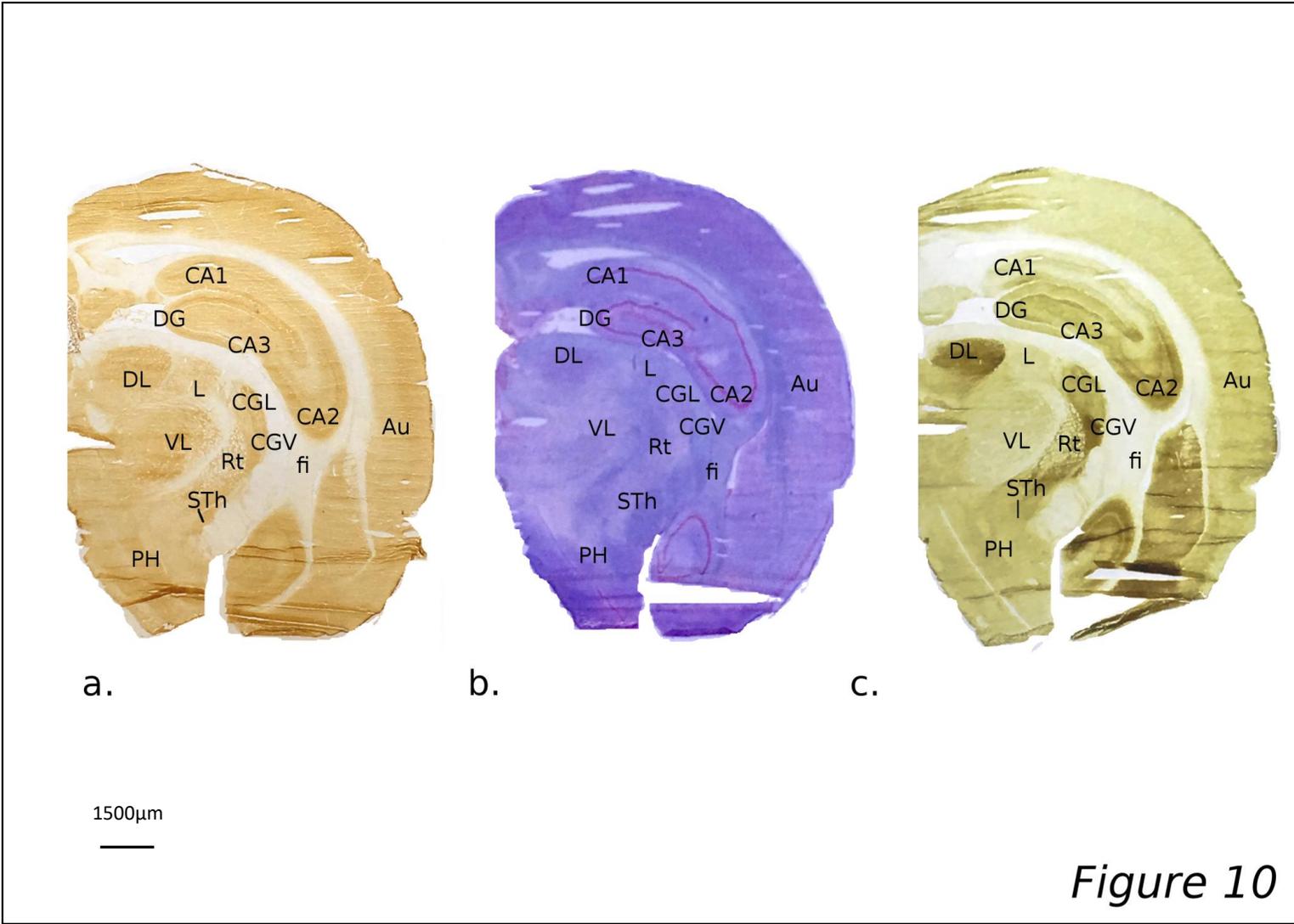
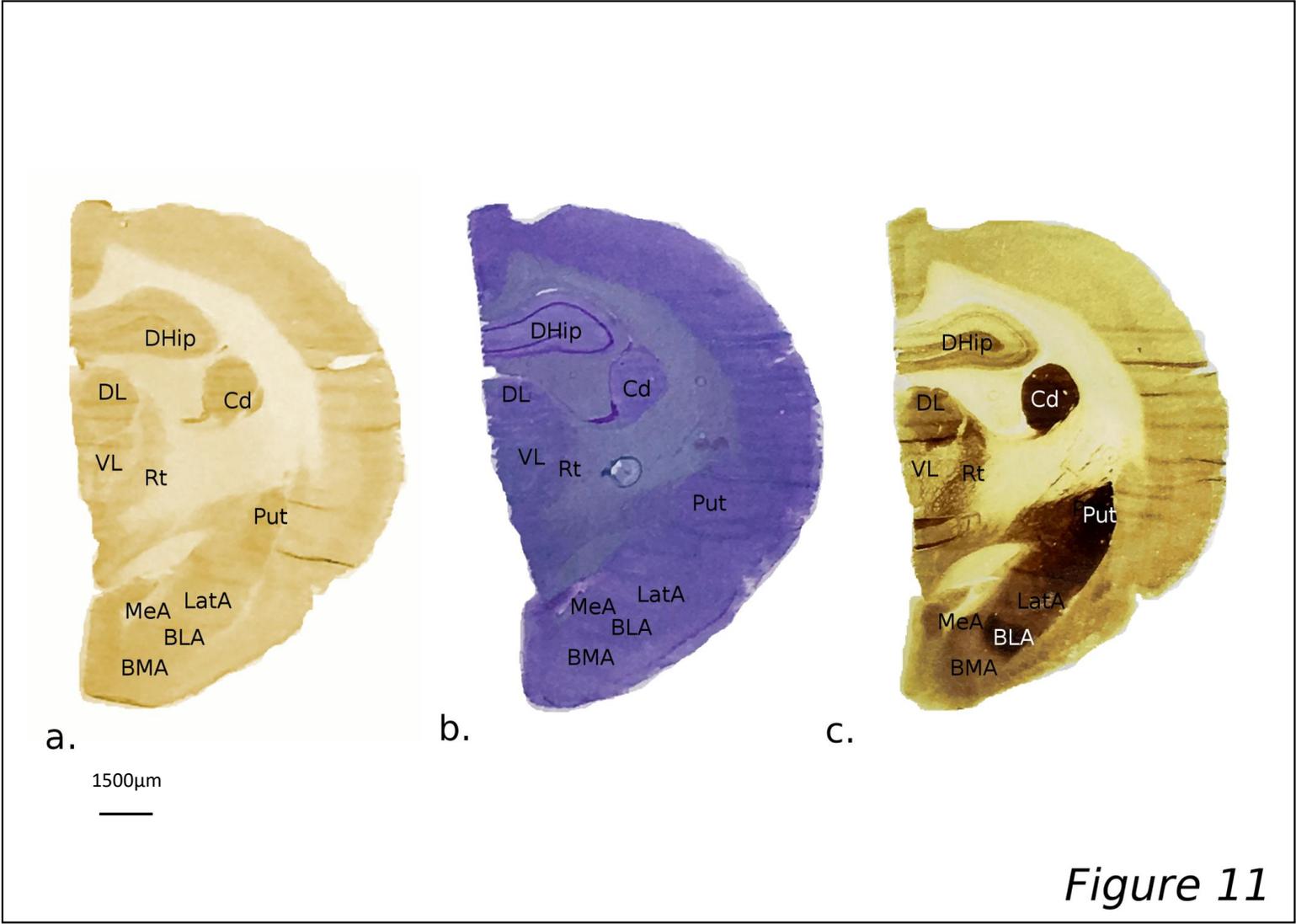


Figure 10



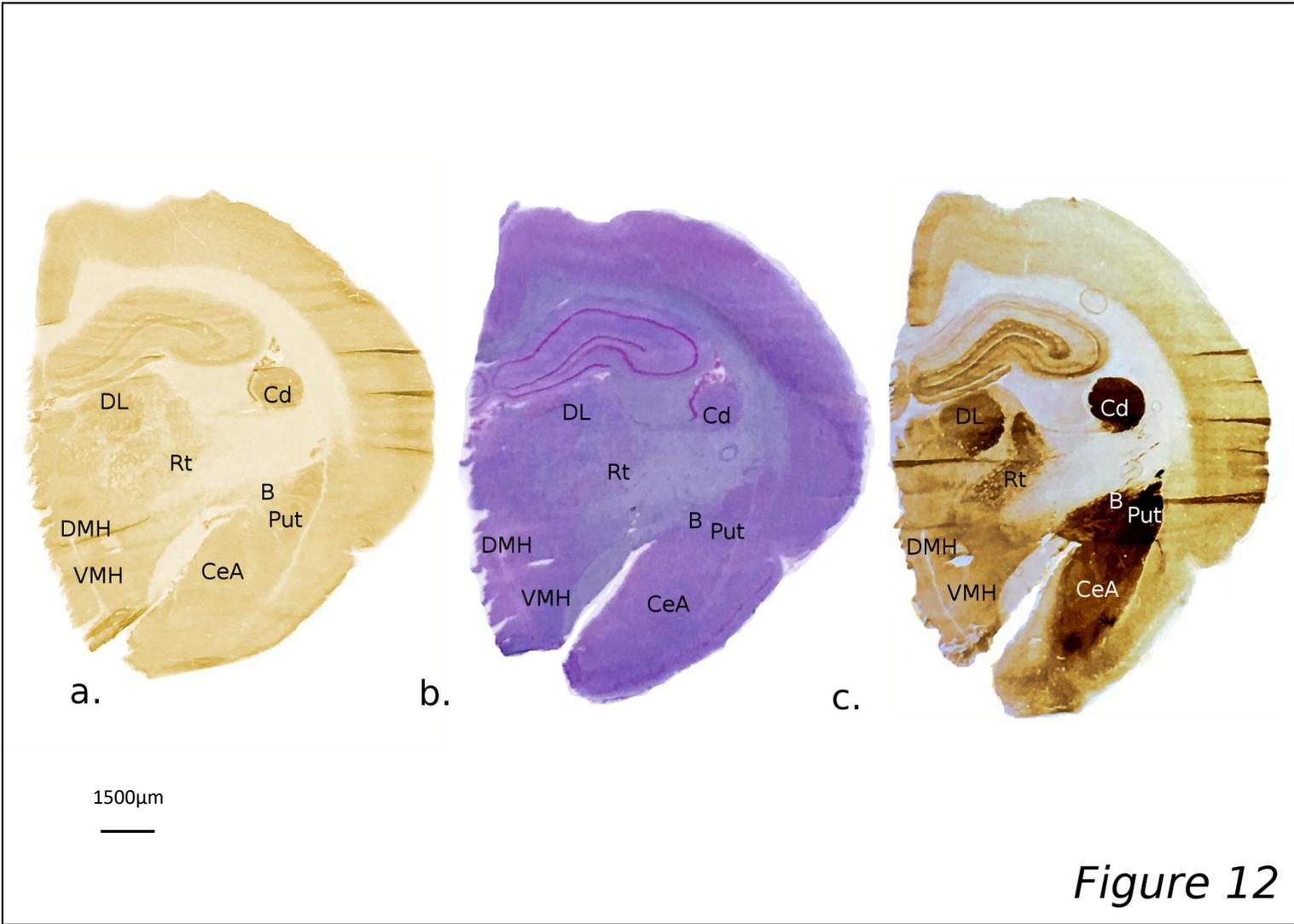


Figure 12

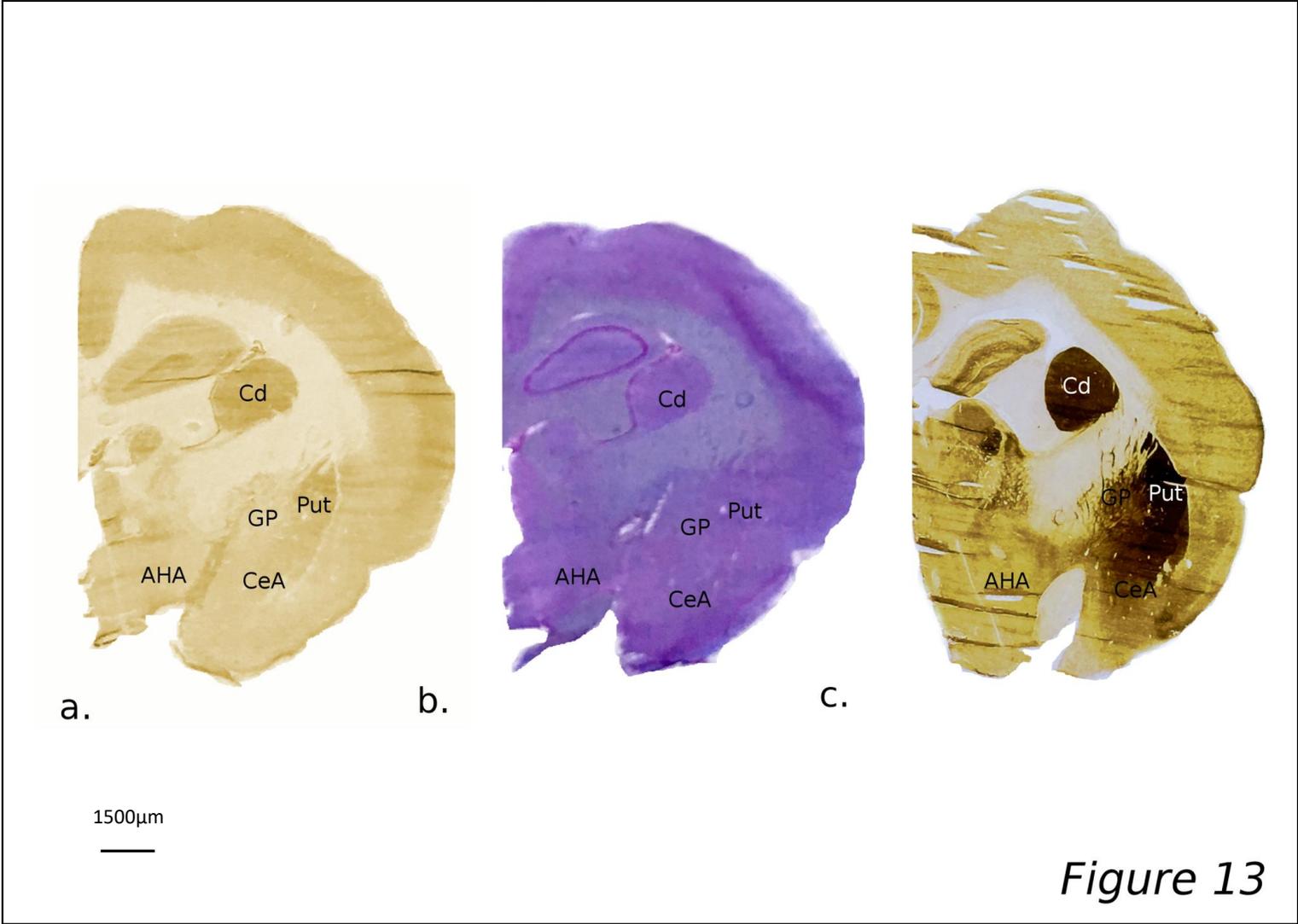


Figure 13

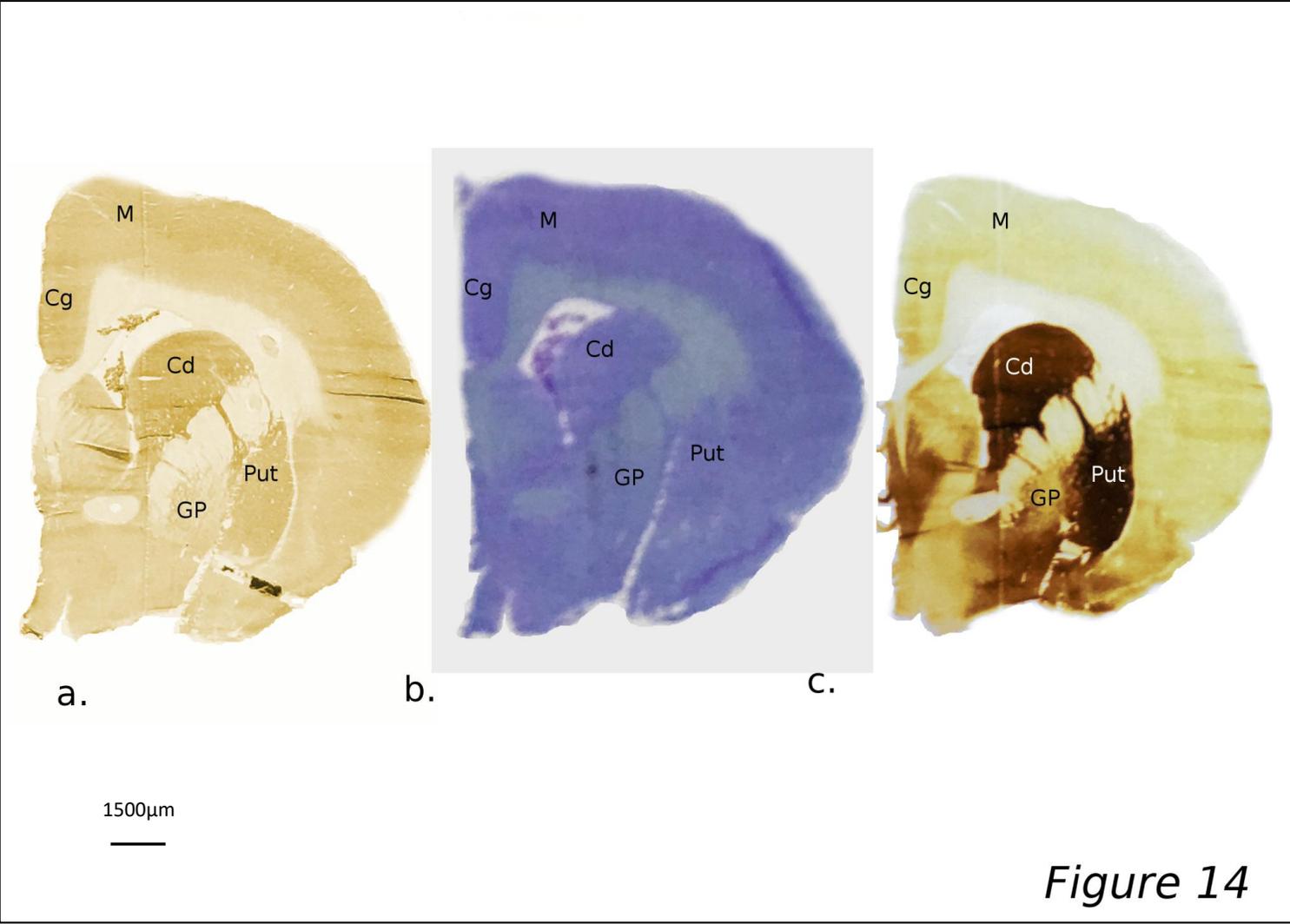
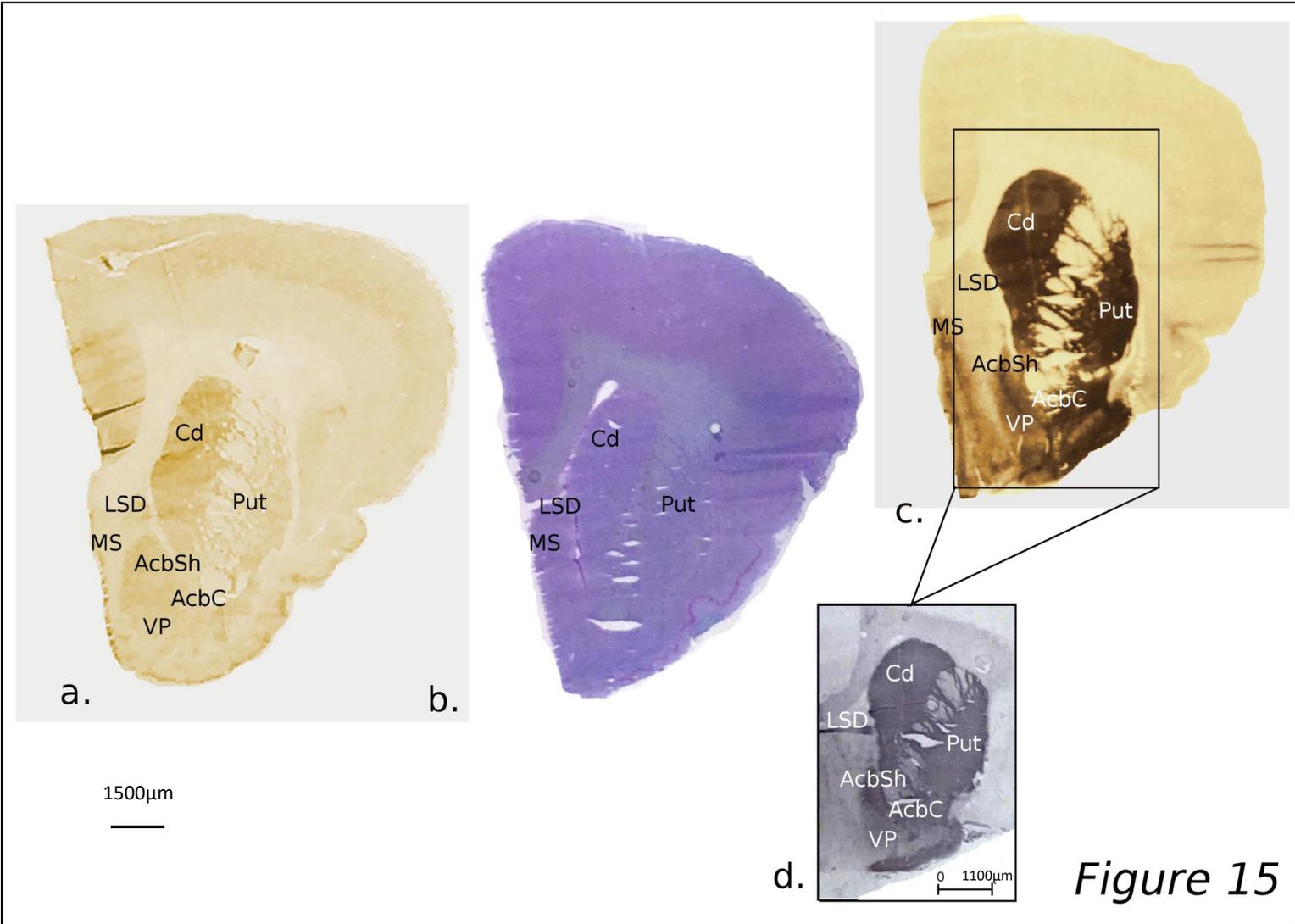
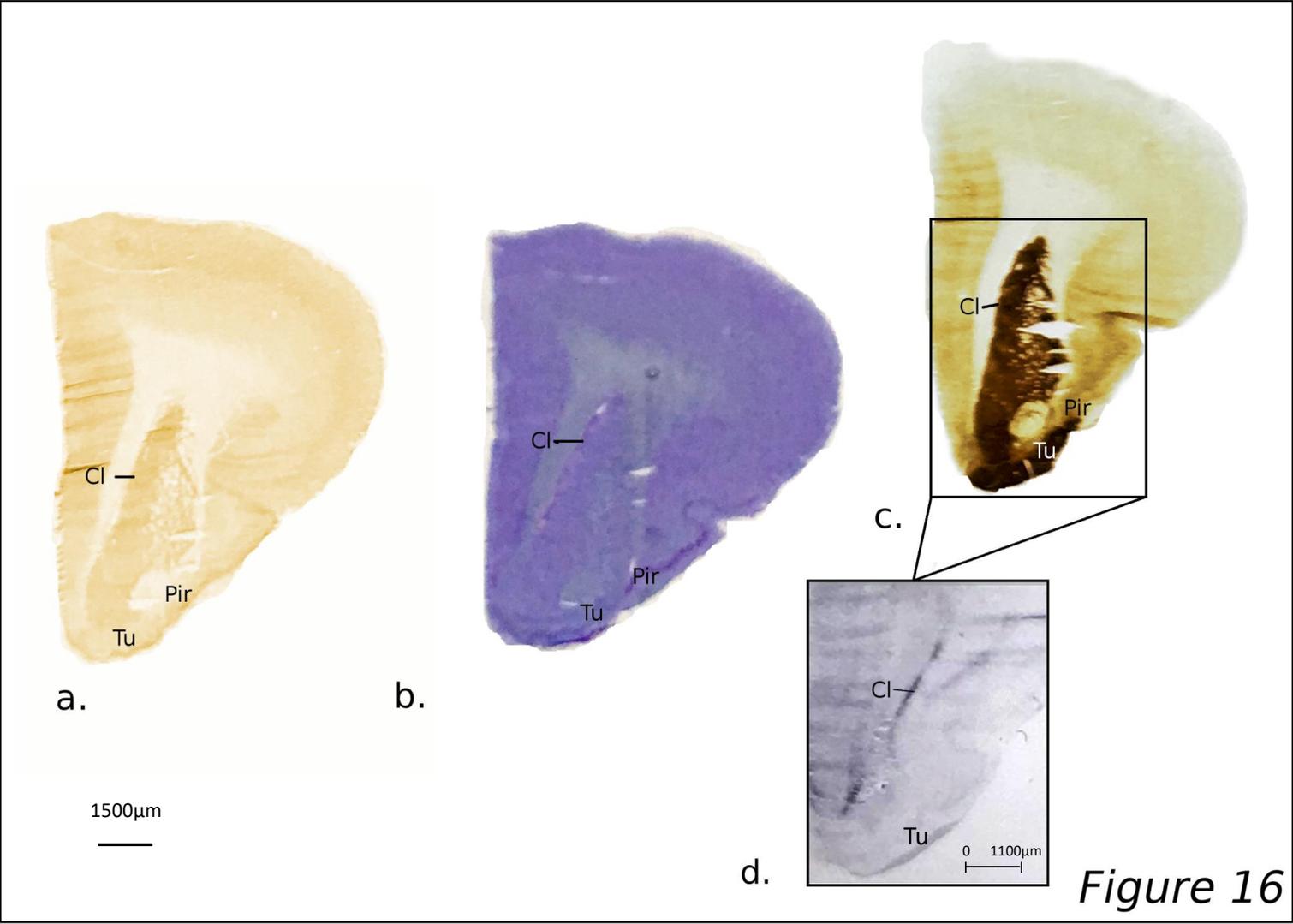


Figure 14





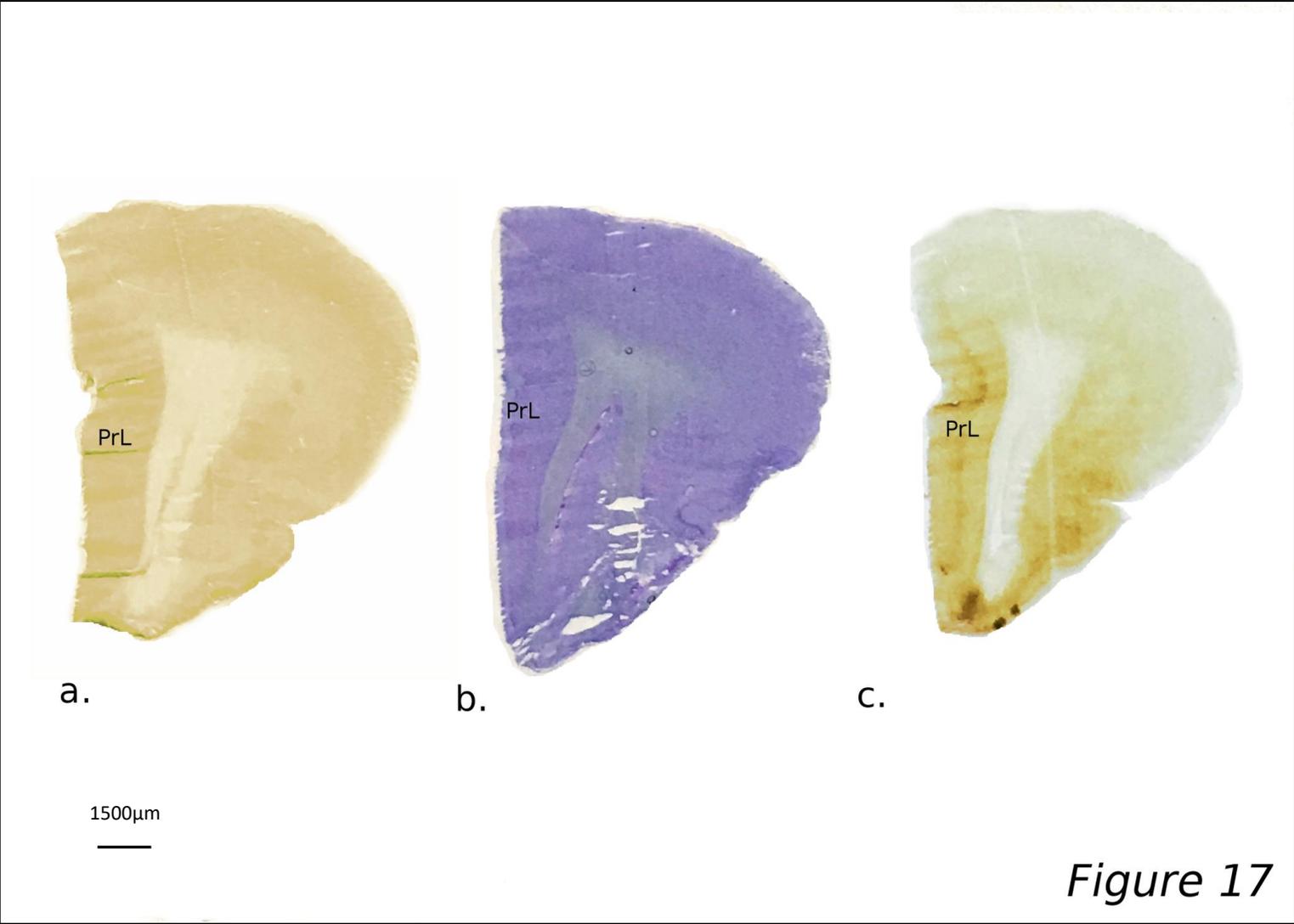


Figure 17

Bibliographie :

ADEME. Les particules de combustion automobile et leurs dispositifs d'élimination. *Rapport ADEME*. (2005).

AIRPARIF. Les critères nationaux de qualité de l'air. (2010) AIRPARIF. Association de surveillance de la qualité de l'air. (2016a)

AIRPARIF. Surveillance et information sur la qualité de l'air en Ile-de-France - Bilan année 2015. (2016b)

ALI N., MATTSSON K., RISSLER, J., KARLSSON, H.M., SVENSSON, C.R., GUDMUNDSSON, A., LINDH, C.H., JONSSON, B.A., CEDERVALL, T. AND KAREDAL, M. Analysis of nanoparticle-protein coronas formed in vitro between nanosized welding particles and nasal lavage proteins. *Nanotoxicology*, (2015), 10(2), 226–234.

ALLEN J. L., LIU X., PELKOWSKI S., PALMER B., CONRAD K., OBERDÖRSTER G., CORY-SLECHTA D. a. Early Postnatal Exposure to Ultrafine Particulate Matter Air Pollution: Persistent Ventriculomegaly, Neurochemical Disruption, and Glial Activation Preferentially in Male Mice. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 939–945

ALLEN J.L., LIU X., WESTON D., PRINCE L., OBERDORSTER G., FINKELSTEIN J., JOHNSTON J., CORY-SLECHTA D.A. b. Developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particulate matter air pollution in mice results in persistent and sex-dependent behavioral neurotoxicity and glial activation. *Toxicological Sciences*, 2014, 140(1), 160–178

ALVAREZ, J. I., KATAYAMA, T. AND PRAT, A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, (2013). 67(12), 1939–1958.

ANDERSEN HR, NIELSEN JB, GRANDJEAN P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. (2000) *Toxicology* 144(1-3):121-127.

ANTINOLO M., WILLIS M.D., ZHOU S. & ABBATT J.P. Connecting the oxidation of soot to its redox cycling abilities. (2015), *Nat Commun* 6, 6812.

BADONNEL K., LACROIX M. C., MONNERIE R., DURIEUX D., CAILLOL M., BALLY, C. Chronic restricted access to food leading to undernutrition affects rat neuroendocrine status and olfactory-driven behaviors. *Hormones and Behavior*, 2012, 62(2), 120–127

BAI, N., KHAZAEI, M., VAN EEDEN, SF., & LAHER, I. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. *Pharmacology and Therapeutics*, (2007) 113(1), 16–29.

BAIO J., WIGGINS L., CHRISTENSEN DL., MAENNER MJ., DANIELS J., WARREN Z., KURZIUS-SPENCER M., ZAHORODNY W., ROBINSON ROSENBERG C., WHITE T., DURKIN MS., IMM P., NIKOLAOU L., YEARGIN-ALLSOPP M., LEE LC., HARRINGTON R., LOPEZ M., FITZGERALD RT., HEWITT A., PETTYGROVE S., CONSTANTINO JN., VEHORN A., SHENOUDA J., HALL-LANDE J., VAN NAARDEN BRAUN K. AND DOWLING NF. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. (2018). *MMWR Surveill Summ*, 67(6), 1–25.

BANKS, WA. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain, Behavior, and Immunity*, (2015). 44(August), 1–8.

BARKER DJP. The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition* 23(6 SUPPL):588S-595S, (2004).

BEAR, F.B., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A., *Neurosciences, à la découverte du cerveau*. 3e édition, traduit de *Neuroscience: Exploring the Brain*, third Edition par Nieoullon A. Editions Pradel. 2010.

BECERRA, TA., WILHELM, M., OLSEN, J., COCKBURN, M. AND RITZ, BR. Ambient air pollution and autism in Los Angeles county, California. *Environmental Health*, (2013).121(3), 380–386.

BENCSIK, A., LESTAEVEL, P. AND GUSEVA CANU, I. Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. *Progress in Neurobiology*, (2018).160, 45–63.

BERNAL-MELENDEZ E., LACROIX C., CALLEBERT J., DURIEUX D., PERSUY A., AOUN J., VALENTINO S., ROUSSEAU-RALLIARD D., TARRADE A., CHAVATTE-PALMER P., SCHROEDER H., BALY C. Short-term effects of daily exposure to diesel exhaust during gestation on the olfactory system development in rabbit pups. *Toxicology Letters*, 2016, 259S, S201-S202

BERNAL-MELÉNDEZ, E., LACROIX M C., BOUILLAUD P., CALLEBERT J., OLIVIER B., PERSUY M A., DURIEUX D., ROUSSEAU-RALLIARD D., AIOUN J., CASSEE F., COUTURIER-TARRADE A., VALENTINO S., CHAVATTE-PALMER P., SCHROEDER H AND BALY C. Repeated gestational exposure to diesel engine exhaust affects the fetal olfactory system and alters olfactory-based behavior in rabbit offspring. *Particle and Fibre Toxicology* 16:5 (2019).

BERNAL-MELENDZ E., Thèse de doctorat de l'Université de Lorraine, préparée à l'Université de Lorraine. (2019b).

BERNARD J.F., BAEZA A., BONNEAU S., DEBERT C., DE PAS A., FAVEZ O., GARNOUSSI P., GHERSI V., JOLY F., KAUFFMANN A., LAJ P., LE TREUT H., MAHÉ F. & PERNOT P. Le carbone suie: enjeu présent et futur. In: *Air Paris Actu.* (2014).

BLOCK, ML., ELDER, A., AUTEN, RL., BILBO, SD., CHEN, H., CHEN, JC., CORY-SLECHTA, DA., COSTA, D., DIAZ-SANCHEZ, D., DORMAN, DC., GOLD, D., GRAY, K., JENG, HA., KAUFMAN, JD., KLEINMAN MT., KIRSHNER, A., LAWLER, C, MILLER, DS., NADADUR, S., RITZ, B., SEMMENS, EO., TONELLI, LH., VERONESI, B., WRIGHT, RO. WRIGHT, R. The Outdoor Air Pollution and Brain Health Workshop. *Neurotoxicology.* (2013). NIH Public Access, 33(5), 972–984.

BLOCK, M. L., & HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology,* (2005).76(2), 77–98.

BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews,* (1995).21(3), 285–300.

BOLTON, JL., HUFF, NC., SMITH, SH., MASON, SN., FOSTER, WM., AUTEN, R. L. AND BILBO, SD. Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environmental Health Perspectives,* (2013). 121(9), 1075–1082.

BOLTON, JL., MARINERO, S., HASSANZADEH, T., NATESAN, D., LE, D., BELLIVEAU, C., MASON, SN., AUTEN, RL. AND BILBO, SD. Gestational exposure to air pollution alters cortical volume, microglial morphology, and microglia-neuron interactions in a sex-specific manner. *Frontiers in Synaptic Neuroscience,* (2017).9(MAY), 1–16.

BOUROTTE C., FORTI M.C., TANIGUCHI S., BICEGO M.C. & LOTUFO P.A. A wintertime study of PAHs in fine and coarse aerosols in Sao Paulo city, Brazil. *Atmospheric Environment* 39, (2005), 3799-811.

BURTSCHER H. Physical characterization of particulate emissions from diesel engines: a review. *Journal of Aerosol Science* 36, (2005) 896-932.

CAFE Working Group on Particulate Matter, Second position paper on particulate matter (2004).

CAFE Baseline Scenarios for the Clean Air for Europe (CAFE) Programme Final Report Development of the Baseline and Policy Scenarios and Integrated Assessment Modelling Framework for the Clean Air for Europe (CAFE) Programme – LOT 1. (2005).

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., VALENCIA-SALAZAR, G., RODRÍGUEZ-ALCARAZ, A., GAMBLING, TM., GARCÍA, R., OSNAYA, N., VILLARREAL-CALDERÓN, A., DEVLIN, RB. AND CARSON CARSON, JL. Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, (2001).24(2), 132–138.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., MARONPOT, RR., TORRES-JARDON, R., HENRÍQUEZ-ROLDÁN, C., SCHOONHOVEN, R., ACUÑA-AYALA, H., VILLARREAL-CALDERÓN A., NAKAMURA J., FERNANDO R., REED W., AZZARELLI B. AND SWENBERG JA. DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration. *Toxicologic Pathology*, (2003). 31(5), 524–538.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., MORA-TISCAREÑO A., ONTIVEROS E., GÓMEZ-GARZA G., BARRAGÁN-MEJÍA G., BROADWAY J., CHAPMAN S., VALENCIA-SALAZAR G., JEWELLS V., MARONPOT RR., HENRÍQUEZ-ROLDÁN C., PÉREZ-GUILLÉ B., TORRES-JARDÓN R., HERRIT L., BROOKS D., OSNAYA-BRIZUELA N., MONROY ME., GONZÁLEZ-MACIEL A., REYNOSO-ROBLES R., VILLARREAL-CALDERON R., SOLT AC. AND ENGLE RW. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: A pilot study with children and dogs. *Brain and Cognition*, (2008a). 68(2), 117–127.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., SOLT AC., HENRÍQUEZ-ROLDÁN C., TORRES-JARDÓN R., NUSE B., HERRITT L., VILLARREAL-CALDERÓN R., OSNAYA N., STONE I., GARCÍA R., BROOKS DM., GONZÁLEZ-MACIEL A., REYNOSO-ROBLES R., DELGADO-CHÁVEZ R. AND REED W. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicologic Pathology*, (2008b). 36(2), 289–310.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS L., FRANCO-LIRA M., HENRÍQUEZ-ROLDÁN C., OSNAYA N., GONZÁLEZ-MACIEL A., REYNOSO-ROBLES R., DOTY R. L. Urban air pollution: Influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2010, 62(1), 91–102

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS L., TORRES-JARDÓN R., KULESZA R. J., PARK S.-B., D'ANGIULLI A. Air pollution and detrimental effects on children's brain. The need for a multidisciplinary approach to the issue complexity and challenges. *Frontiers in Human Neuroscience*, 2014, 1–7

CALDERON-GARCIDUENAS L., TORRES-JARDON R. The Impact of Air Pollutants on the Brain. *JAMA Psychiatry*, 2015, 59812, 5–6.

CALDERON-GARCIDUENAS L., KULESZA R.J., DOTY R.L., D'ANGIULLI A., TORRES-JARDON R. Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environmental Research.*, 2015, 137: 157–169.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., REYNOSO-ROBLES, R., VARGAS- MARTÍNEZ, J., GÓMEZ-MAQUEO-CHEW, A., PÉREZ-GUILLÉ, B., MUKHERJEE, PS., TORRES-JARDÓN R., PERRY G., AND GÓNZALEZ-MACIEL, A. Prefrontal white matter pathology in air pollution exposed Mexico City young urbanites and their potential impact on neurovascular unit dysfunction and the development of Alzheimer's disease. *Environmental Research*, (2016). 146, 404–417.

CAMPOS-BEDOLLA, P., WALTER, FR., VESZELKA, S. AND DELI, MA. Role of the Blood-Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System. *Archives of Medical Research*, (2014). 45(8), 610–638.

CARTER, AM. Animal Models of Human Placentation - A Review. *Placenta*, 28(SUPPL.), (2007). S41–S47.

CHAN T.L., NING Z., WANG J.S., CHEUNG C.S., LEUNG C.W. & HUNG W.T. Gaseous and particle emission factors from the selected on-road petrol/gasoline, diesel, and liquefied petroleum gas vehicles. *Energy & Fuels* 21, (2007). 2710-8.

CHAVATTE-PALMER P., LAIGRE P., SIMONOFF E., CHESNE, P., CHALLAH-JACQUES, M. AND R. JP. In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. (2008). 69, 859–869.

CHENG, YS., YEH, HC., MAUDERLY, JL. AND MOKLER, BV. Characterization of diesel exhaust in a chronic inhalation study. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45:547-55, (1984).

CITEPA. Rapport national d'inventaire - Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France - Séries sectorielles et analyses étendues (Format SECTEN), (2015). 333 p.

COMMISSION EUROPÉENNE. La Commission se félicite de l'accord des États membres sur des contrôles rigoureux de la pollution atmosphérique générée par les émissions des véhicules. (2015), URL http://europa.eu/rapid/press-release_IP-15-5945_fr.htm.

COMITE CONSTRUCTEURS FRANÇAIS D'AUTOMOBILES. L'industrie automobile française - Analyse et statistiques 2018. (2017). URL https://ccfa.fr/wp-content/uploads/2018/09/analyse_statistiques_2018_fr.pdf

CONCEIÇÃO GM., MIRAGLIA SG., KISHI HS., SALDIVA PH. AND SINGER JM. Air pollution and child mortality: A time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Environmental Health Perspectives*, (2001). 109, 347–350.

COSTA L.G., COLE T.B., COBURN J., CHANG Y.C., DAO K., ROQUE P. Neurotoxicants Are in the Air: Convergence of Human, Animal, and In Vitro Studies on the Effects of Air Pollution on the Brain. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 736385

COUREAUD G., LANGLOIS D., SICARD G., SCHAAL B. Newborn rabbit responsiveness to the mammary pheromone is concentration-dependent. *Chemical Senses*, 2004, 29(4), 341–350

CRÉPEAUX G., BOUILLAUD-KREMERIK P., SIKHAYEVA N., RYCHEN G., SOULIMANI R., SCHROEDER H. Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: A role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. *Toxicology Letters* 211, 2012, 105–113

CRÉPEAUX G., BOUILLAUD-KREMERIK P., SIKHAYEVA N., RYCHEN G., SOULIMANI R., SCHROEDER H. Late effects of perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. *Toxicology Letters* 221, 2013, 40–46

CRÉPEAUX G., GROVA N., BOUILLAUD-KREMARIK P., SIKHAYEVA N., SALQUÈBRE G., RYCHEN G., SOULIMANI R., APPENZELLER B., SCHROEDER H. Short-term effects of a perinatal exposure to a 16-polycyclic aromatic hydrocarbon mixture in rats: Assessment of early motor and sensorial development and cerebral cytochrome oxidase activity in pups. *NeuroToxicology* 43, 2014, 90–101

CREWS L, HUNTER D. Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspect Dev Neurobiol*, (1994) 2:151-161.

DAVIS, D. A., BORTOLATO, M., GODAR, S. C., SANDER, T. K., IWATA, N., PAKBIN, P., ... MORGAN, T. E. Prenatal Exposure to Urban Air Nanoparticles in Mice Causes Altered Neuronal Differentiation and Depression-Like Responses. *PLoS ONE*, (2013). 8(5), 1–7.

DENCKER L, ERIKSSON P. Susceptibility in utero and upon neonatal exposure. *Food Additives and Contaminants* 15(SUPPL):37-43. (1998).

DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT AND HERITAGE C. State of the air : national ambient air quality status and trends report 1991-2001. (2004).

DOCTER, D., WESTMEIER, D., MARKIEWICZ, M., STOLTE, S., KNAUER, S. K., & STAUBER, R. H. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chemical Society Reviews*, (2015). 44(17), 6094–6121.

DONALDSON, K., TRAN, L., JIMENEZ, L. A., DUFFIN, R., NEWBY, D. E., MILLS, N., ... STONE, V. Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, (2005). 2, 1–14.

DORMAN DC, ALLEN SL, BYCZKOWSKI JZ, CLAUDIO L, FISHER JE, JR FISHER JW, HARRY GJ, LI AA, MAKRIS SL, PADILLA S, SULTATOS LG, MILESON BE. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. III: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. (2001) *Environmental Health Perspectives* 109 (Suppl 1):101-111.

DOTY, R. L. Neurobiology of Disease Olfaction in Parkinson ' s disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, (2012a). 46(3), 527–552.

DOTY, R. L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.*, (2012b). 46(3), 527–552.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, (2012c). 8(6), 329–339.

DUHAIME, AC. Large Animal Models of Traumatic Injury to the Immature Brain. *Developmental Neuroscience*, (2006). 28(4-5), 380–387.

DUMONT, M., LALONDE, R., GHERSI-EGEA, J. F., FUKUCHI, K., & STRAZIELLE, C. Regional acetylcholinesterase activity and its correlation with behavioral performances in 15-month old transgenic mice expressing the human C99 fragment of APP. *Journal of Neural Transmission*, (2006). 113(9), 1225–1241.

EERENS H., PETROULA D., COLAFA J., KALOGNOMOU L., LARSSSEN S., VAN PUL A., GIANNOULI M., MELLIOS G., JONSON J.E., SWART R., VAN BREE L., HETTELINGH J.-P., DE LEEUW F., CABALA R., KLIMONT Z., SCHOEPP W., MOUSSIOPOULOS N., SAMARAS Z., ELEFThERiADOU S., BARRET K., TARRASON L., DENTENER F., VAN DINGENEN R., KROL M. & ADMAS M. European environmental outlook 2005: background document air quality 1990-2030. European Environment Agency. (2005).

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., & FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, (1961). 7(2), 88–95.

FALCON-RODRIGUEZ, C. I., OSORNIO-VARGAS, A. R., SADA-OVALLE, I., & SEGURA-MEDINA, P. Aeroparticles, composition, and lung diseases. *Frontiers in Immunology*, (2016). 7(JAN), 1–9.

FATIMA, M., SRIVASTAV, S., & MONDAL, A. C. Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *International Journal of Developmental Neuroscience*. (2017).

FINNIE, J. Comparative approach to understanding traumatic injury in the immature, postnatal brain of domestic animals. *Australian Veterinary Journal*. (2012). 90(8), 301–307.

FISCHER B., CHAVATTE-PALMER P., VIEBAHN C., NAVARRETE SANTOS A., DURANTHON V. Rabbit as a reproductive model for human health, *Reproduction*, 2012, 144 1–10

FONKEN, L. K., XU, X., WEIL, Z. M., CHEN, G., SUN, Q., RAJAGOPALAN, S., & NELSON, R. J. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Molecular Psychiatry*, (2011).16(10), 987–995.

FURUKAWA S, KURODA Y, SUGIYAMA A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol*. 2014, 27(1) :11–8.

GAZZANIGA, M.S., IVRY, R.B. & MANGUN, G.R. (2002). *Cognitive Neuroscience. The biology of the Mind – Second Edition*. Norton & Company: New York.

GELLER M.D., NTZIACHRISTOS L., MAMAKOS A., SAMARAS Z., SCHMITZ D.A., FROINES J.R. & SIOUTAS C. Physicochemical and redox characteristics of particulate matter (PM) emitted from gasoline and diesel passenger cars. *Atmospheric Environment* 40, (2006), 6988–7004.

GENC S., ZADEOGLULARI Z., FUSS S. H., GENC K. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *Journal of Toxicology*, 2012

GHIO, A. J., SMITH, C. B., & MADDEN, M. C. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, (2012). 18(2), 144–150.

GIAKOUMIS E.G., RAKOPOULOS C.D., DIMARATOS A.M. & RAKOPOULOS D.C. Exhaust emissions with ethanol or n-butanol diesel fuel blends during transient operation: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 17, (2013), 170-90.

GIL-BEA F.J., GARCÍA-ALLOZA M., DOMÍNGUEZ J., MARCOS B., JAVIER RAMÍREZ M. Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. *Neuroscience Letters*, Volume 375, Issue 1, 25 February 2005, Pages 37-41

GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R., GARCÍA-BARRERA, T., & GÓMEZ-ARIZA, J. L. Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2014).98, 321–326.

GONZALEZ-LIMA F., JONES D. Quantitative Mapping of Cytochrome Oxidase Activity in the Central Auditory System of the Gerbil: A Study with Calibrated Activity Standards and Metal-Intensified Histochemistry *Brain Research*, 1994, 660: 3449.

GORDON, M. N., & FINCH, C. E. Topochemical localization of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in mouse brain, (1984). *18*, 364–368.

GRAETER, L.J., MORTENSEN, M.E. Kids are different: developmental variability in toxicology. *Toxicology* 1996, *111*, 15–20.

GRANDJEAN, P., LANDRIGAN, P.J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 368, 2006. 2167–2178.

GUXENS, M., AGUILERA, I., BALLESTER, F., ESTARLICH, M., FERNANDEZ-SOMOANO, A., LERTXUNDI, A., ... SUNYER, J. Prenatal exposure to residential air pollution and infant mental development: Modulation by antioxidants and detoxification factors. *Environmental Health Perspectives*, (2012). *120*(1), 144–149.

GUXENS, M., GARCIA-ESTEBAN, R., GIORGIS-ALLEMAND, L., FORNS, J., BADALONI, C., BALLESTER, F., ... SUNYER, J. Air pollution during pregnancy and childhood cognitive and psychomotor development: Six european birth cohorts. *Epidemiology*, (2014). *25*(5), 636–647.

GUXENS, M., LUBCZYŃSKA, M. J., MUETZEL, R. L., DALMAU-BUENO, A., JADDOE, V. W. V., HOEK, G., ... EL MARROUN, H. Air Pollution Exposure During Fetal Life, Brain Morphology, and Cognitive Function in School-Age Children. *Biological Psychiatry*, (2018). *84*(4), 295–303.

HABERTA, C., GARNIERA, R. Health effects of diesel exhaust: A state of the art, *Revue des Maladies Respiratoires*. (2015), *32*, 138—154.

HARTZ, A. M. S., BAUER, B., BLOCK, M. L., HONG, J.-S., & MILLER, D. S. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, (2008). *22*(8), 2723–2733.

HARRIS, M. H., GOLD, D. R., RIFAS-SHIMAN, S. L., MELLY, S. J., ZANOBETTI, A., COULL, B. A., ... OKEN, E. Prenatal and childhood traffic-related air pollution exposure and childhood executive function and behavior. *Neurotoxicology and Teratology*. (2016).

HEUSINKVELD, H. J., WAHLE, T., CAMPBELL, A., WESTERINK, R. H. S., TRAN, L., JOHNSTON, H., ... SCHINS, R. P. F. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *NeuroToxicology*, (2016). *56*, 94–106.

HOEK, G., BRUNEKREEF, B., GOLDBOHM, S., FISCHER, P., & VAN DEN BRANDT, P. A. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: A cohort study. *Lancet*, 360(9341), (2002). 1203–1209.

HOUGAARD K. S., JENSEN K., NORDLY P., TAXVIG C., VOGEL U., SABER A. T., WALLIN H. Effects of Prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 2008, 5, 3

HOUGAARD, K. S., CAMPAGNOLO, L., CHAVATTE-PALMER, P., TARRADE, A., ROUSSEAU-RALLIARD, D., VALENTINO, S., ... CASSEE, F. R. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reproductive Toxicology*, (2015). 56, 118–140.

IBALD-MULLI, A, WICHMANN, H. E., KREYLING, W., & PETERS. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med*, (2002). 15(2), 189–201.

IBANEZ C., SUHUARD D., TESSIER C., DELISSEN O., LESTAEVEL P., DUBLINEAU I., GOURMEELON P. Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2014, 40, 477- 488

IFEN. (2006). L 'environnement en France

IMTENAN S., VARMAN M., MASJUKI H.H., KALAM M.A., SAJJAD H., ARBAB M.I. & FATTAH I.M.R. Impact of low temperature combustion attaining strategies on diesel engine emissions for diesel and biodiesels: A review. *Energy Conversion and Management* 80, (2014), 329-56.

KAPPOS, A. D., BRUCKMANN, P., EIKMANN, T., ENGLERT, N., HEINRICH, U., HÖPPE, P., ... WICHMANN, H. E. Health effects of particles in ambient air. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, (2004). 207(4), 399–407.

KIM KI-HYUN, KABIR EHSANUL, K. S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Archives of Microbiology*, 137(3), (2015). 194–199.

KIM, D., CHEN, Z., ZHOU, L.-F., & HUANG, S.-X. Air pollutants and early origins of respiratory diseases. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, (2018). 4(2), 75–94.

KING, S., & LAPLANTE, D. P. The effects of prenatal maternal stress on children 's cognitive development : Project Ice Storm, 8(January 1998), (2005). 35–45.

KINOSHITA Y., SHIGA H., WASHIYAMA K., OGAWA D., AMANO R., ITO M., MIWA T. Thallium transport and the evaluation of olfactory nerve connectivity between the nasal cavity and olfactory bulb. *Chemical Senses*, 2008, 33(1), 73–78

KLOCKE, C., ALLEN, J. L., SOBOLEWSKI, M., MAYER-PRÖSCHEL, M., BLUM, J. L., LAUTERSTEIN, D., ... CORY-SLECHTA, D. A. Neuropathological Consequences of Gestational Exposure to Concentrated Ambient Fine and Ultrafine Particles in the Mouse. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, (2017a). kfx010.

KLOCKE, C., ALLEN, J. L., SOBOLEWSKI, M., MAYER-PRÖSCHEL, M., BLUM, J. L., LAUTERSTEIN, D., ... CORY-SLECHTA, D. A. Neuropathological consequences of gestational exposure to concentrated ambient fine and ultrafine particles in the mouse. *Toxicological Sciences*, (2017b). 156(2), 492–508.

KREYLING, WG. Discovery of unique and ENM- specific pathophysiologic pathways: Comparison of the translocation of inhaled iridium nanoparticles from nasal epithelium versus alveolar epithelium towards the brain of rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (2016). 299, 41–46.

KYJOVSKA, Z. O., JACOBSEN, N. R., SABER, A. T., BENGTSON, S., JACKSON, P., WALLIN, H., & VOGEL, U. DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice. *Mutagenesis*, (2015). 30(4), 499–507.

L'AZOU B., JORLY J., ON D., SELLIER E., MOISAN F., FLEURY-FEITH J., OHAYON-COURTÈS C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 2008, 5, 22

LANDRIGAN, P.J., KIMMEL, C.A., CORREA, A., ESKENAZI, B. Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ. Health Perspect*, 2004. 112, 257– 265.

LANDRIGAN, P.J., GOLDMAN, L.R. Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Aff (Millwood)* 30, 2011. 842– 850.

LANPHEAR, B. P. The Impact of Toxins on the Developing Brain. *Annual Review of Public Health*, (2015). 36(1), 211–230.

LAPLANTE, D. P., BRUNET, A., SCHMITZ, N., CIAMPI, A., & KING, S. Project Ice Storm : Prenatal Maternal Stress Affects Cognitive and Linguistic Functioning in 5 2 -Year-Old Children, (September), (2008). 1063–1072.

LAPLANTE, D. P., ZELAZO, P. R., BRUNET, A., & KING, S. Functional Play at 2 Years of Age : Effects of Prenatal Maternal Stress, (2007).

LIATI A. & EGGENSCHWILER P.D. Characterization of particulate matter deposited in diesel particulate filters: Visual and analytical approach in macro-, micro- and nano-scales. *Combustion and Flame* 157, (2010). 1658-70.

LINSE S., CABALEIRO-LAGO C., XUE W F., LYNCH I., LINDMAN S., THULIN E., DAWSON K. a. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007,104 (21), 8691–8696

LUCK W, NAU H, HANSEN R, STELDINGER R. Extent of nicotine and cotinine transfer to the human foetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers, (1985).

MA J.Y., YOUNG S.H., MERCER R.R., BARGER M., SCHWEGLER-BERRY D., MA J.K. & CASTRANOVA V. Interactive effects of cerium oxide and diesel exhaust nanoparticles on inducing pulmonary fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 278, (2014). 135-47.

MARICQ M.M. Chemical characterization of particulate emissions from diesel engines: A review. *Journal of Aerosol Science* 38, (2007) 1079-118.

MAYER A., CZERWINSKI J., WICHSER A., ULRICH A., KASPER M. & MOONEY J. Metal-oxide particles in combustion engine exhaust. *SAE Technical Papers*. (2010).

MENDOLA, P., SELEVAN, S. G., GUTTER, S., & RICE, D. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, (2002). 8(3), 188–197.

NEL, A. Air Pollution – Related Illness : Effects of Particles. *Science*, 308(5723), (2005). 804–806.

NEWS B.B.C. Australia approves controversial Carmichael coal mine. URL <http://www.bbc.com/news/world-australia-34535947>. (2015)

OBERDÖRSTER, G., ELDER, A., & RINDERKNECHT, A. Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern? *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, (2009). 9(8), 4996–5007.

OLIVIER B., ZALKA L., OLRYS J.C., JONDREVILLE C., BOUILLAUD-KREMERIK P., SCHROEDER H. Perinatal exposure of rat pups to the HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD) a-isomer affects sexual maturation and copulatory behavior at the adult stage. *Toxicology Letters*, 2016, 259S, S73–S247

OLNEY, J.W. New insights and new issues in developmental neurotoxicology. *Neurotoxicology*, 2002, 23, 659–668.

OMS (2005) Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005. In: Synthèse de l'évaluation des risques.

OSTRO B., BROADWIN R., GREEN S., FENG W. Y., LIPSETT M. Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: Results from CALFINE. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(1), 29–33

PEIFFER J, STRAZIELLE C, SCHROEDER H. Investigation of the brain distribution of the neuronal cytochrome oxidase activity in adult mice submitted to a subacute benzo (a)pyrene administration. (2008).

PEIFFER, J., COSNIER, F., GROVA, N., NUNGE, H., SALQUÈBRE, G., DECRET, M. J., SCHROEDER, H. Neurobehavioral Toxicity of a Repeated Exposure (14 Days) to the Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Fluorene in Adult Wistar Male Rats. (2013). *PLoS ONE*, 8(8), 1–11.

PERERA FP, TANG D, TU Y-H, CRUZ LA, BORJAS M, BERNERT T, WHYATT RM. Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage. (2004) *Environmental Health Perspectives* **112**(10):1133-1136.

PERERA, F. P., RAUH, V., WHYATT, R. M., TSAI, W. Y., TANG, D., DIAZ, D., ... KINNEY, P. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Environmental Health Perspectives*, (2006). *114*(8), 1287–1292.

PERERA FP, LI Z, WHYATT R, HOEPNER L, WANG S, CAMANN D, RAUH V. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics*. (2009). *124*(2):e195-202.

PERERA, F. P., TANG, D., WANG, S., VISHNEVETSKY, J., ZHANG, B., DIAZ, D., ... RAUH, V. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years. *Environmental Health Perspectives*, (2012). 120(6), 921–926.

PETERS, A., VERONESI, B., CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L., GEHR, P., CHEN, L. C., GEISER, M., ... SCHULZ, H. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Particle and Fibre Toxicology*, (2006). 3, 13.

PETERSON B. S., RAUH V. a., BANSAL R., HAO X., TOTH Z., NATI G., PERERA F. Effects of Prenatal Exposure to Air Pollutants (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on the Development of Brain White Matter, Cognition, and Behavior in Later Childhood. *JAMA Psychiatry*, 2015, 90027(6), 531–540

PETITJEAN O. Hazelwood: quel avenir pour la centrale au charbon inavouable d'Engie en Australie? URL <http://multinationales.org/Hazelwood-quel-avenir-pour-la-centrale-au-charbon-inavouable-d-Engie-en>. (2016)

POPE C. A., BURNETT R. T., THURSTON G. D., THUN M. J., CALLE E. E., KREWSKI D., GODLESKI J. J. Cardiovascular Mortality and Long-Term Exposure to Particulate Air Pollution: Epidemiological Evidence of General Pathophysiological Pathways of Disease. *Circulation*, 2004, 109(1), 71–77

POPOVICHEVA O., ENGLING G., LIN K.T., PERSIANTSEVA N., TIMOFEEV M., KIRIEVA E., VOLK P., HUBERT A. & WACHTMEISTER G. Diesel/biofuel exhaust particles from modern internal combustion engines: Microstructure, composition, and hygroscopicity. *Fuel* (2015) 157, 232-9.

REACH. (2007). Directive 2006/1907/EC on Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals (REACH). *Official Journal of the European Union*, 396, 1–849.

REED, M.D., BESUNDER, J.B. Developmental pharmacology: ontogenic basis of drug disposition. *Pediatr. Clin. North Am* 36, 1989. 1053–1074.

REY, N. L., WESSON, D. W., & BRUNDIN, P. The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, (2018). 109, 226–248.

RICE D., BARONE S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, Vol 108, Supplement, 2000

RUIZ A, GUTIERREZ L, CACERES-VELEZ PR, SANTOS D, CHAVES SB, FASCINELI ML, GARCIA MP, AZEVEDO RB, M. M. Biotransformation of magnetic nanoparticles as a function of coating in a rat model. (2015).

SARNAT, HB., FLORES-SARNAT, L. AND WEI, XC. Olfactory Development, Part 1: Function, from Fetal Perception to Adult Wine-Tasting. *Journal of Child Neurology*, (2017). 32(6), 566–578.

SCHAAL B., COUREAUD G., LANGLOIS D., GINIES C., SEMON E., PERRIER G. Chemical and behavioral characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, 2003, 424, 68–72

SCHROEDER H. La pollution environnementale : un risque pour le cerveau en développement. Lettre de 2012 adressée au Colloque de 2012 de l'ART

SHARMA, H. S., ALI, S. F., HUSSAIN, S. M., SCHLAGER, J. J., & SHARMA, A. Influence of Engineered Nanoparticles from Metals on the Blood-Brain Barrier Permeability, Cerebral Blood Flow, Brain Edema and Neurotoxicity. An Experimental Study in the Rat and Mice Using Biochemical and Morphological Approaches. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, (2009). 9(8), 5055–5072.

SIVERTSEN B. Air quality monitoring and management system in Ho Chi Minh, Viet Nam. BAQ Conference. (2004)

SIVERTSEN B. & EL SEOUD A.A. The air pollution monitoring network for Egypt. International Conference on Atmospheric Pollution. (2004)

SLY, P.D., FLACK, F. Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1140, 163–183.

STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION ADMINISTRATION. Report on the state of atmospheric environment in China of 2002. (2002).

STEINER S., BISIG C., PETRI-FINK A. & ROTHEN-RUTISHAUSER B. Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms. *Arch Toxicol* (2016) 90, 1541-53.

STEINER S., MUELLER L., POPOVICHEVA O.B., RAEMY D.O., CZERWINSKI J., COMTE P., MAYER A., GEHR P., ROTHEN-RUTISHAUSER B. & CLIFT M.J. Cerium dioxide nanoparticles can interfere with the associated cellular mechanistic response to diesel exhaust exposure. *Toxicol Lett* 214, (2012), 218- 25.

STEWART, AM. AND KALUEFF, AV. Developing better and more valid animal models of brain disorders. *Behavioural Brain Research*. 2015 276, 28–31.

SUK, W.A., MURRAY, K., AVAKIAN, M.D. Environmental hazards to children's health in the modern world. *Mutat. Res.* 544, 2003. 235–242.

SUZUKI, T., OSHIO, S., IWATA, M., SABURI, H., ODAGIRI, T., UDAGAWA, T., ... TAKEDA, K. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Particle and Fibre Toxicology*, (2010). 7, 7.

TRANSPORT & ENVIRONMENT. Don't breathe here - beware the invisible killer. (2015)

U.S.E.P.A. Health assessment document for diesel engine exhaust. (2002)

U.S.E.P.A. Criteria pollutants - metropolitan area trends. (2003)

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Peak air quality statistics for the six principal pollutants by metropolitan statistical area. (2003)

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Air trends. (2006)

VALENTINO S., TARRADE A., AIOUN J, MOURIER E., RICHARD C., AGIER L., BOERE J.A., CASSEE F.R., SLAMA R., CHAVATTE-PALMER P. Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. *Particle and Fibre Toxicology*, 2016, 13:39

VALENTINO S. Thèse de doctorat de l'Université Paris Saclay, préparée à l'Université de Paris Sud. (2016b).

VAN BERLO, D., ALBRECHT, C., KNAAPEN, A. M., CASSEE, F. R., GERLOFS-NIJLAND, M. E., KOOTER, I. M., ... SCHINS, R. P. F. Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain. *Archives of Toxicology*, (2010). 84(7), 553–562.

VANDERWOLF, C. H. Cerebral activity and behavior: Control by central cholinergic and serotonergic systems. *International Review of Neurobiology*, (1988). 30(C), 225–340.

VOLK H. E., LURMANN F., PENFOLD B., HERTZ-PICCIOTTO I., MCCONNELL R. Traffic-Related Air Pollution, Particulate Matter, and Autism. *JAMA Psychiatry*, 2013, 70(1), 71

WALKER, B., JR. Pediatric environmental health. *J Natl Med Assoc* 97, 2005. 262–269.

WEISS, B. Vulnerability of children and the developing brain to neurotoxic hazards. *Environ. Health Perspect* 108 Suppl 3, 2000. 375–381.

WESTERHOLM R. & EGEBACK K.E. Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 4, (1994) 13-23.

WHO Air Quality Guidelines – Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide (2006)

WHO. Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project: Technical Report, World Health Organisation, Copenhagen, Denmark. (2013). Retrieved from http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/193108/REVIHAAP-Final-technical-report-final-version.pdf.

WHO. Burden of disease from Household Air Pollution for 2012. (2014).

WHO. Ambient air pollution: a global assessment of exposure and burden of disease. (2016).

WICHMANN H.E. Diesel exhaust particles. *Inhalation Toxicology* 19, (2007), 241-4.

WIN-SHWE T. T., FUJIMAKI H. Nanoparticles and Neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(9), 6267–6280

WONG, C. T., WAIS, J., & CRAWFORD, D. A. Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing Autism Spectrum Disorders. *The European Journal of Neuroscience*. (2015).

WONG-RILEY M. Cytochrome Oxidase: An Endogenous Metabolic Marker for Neuronal Activity *Trends in Neurosciences*, 1989, 12: 94 101

XING, Y. F., XU, Y. H., SHI, M. H., & LIAN, Y. X. The impact of PM2.5 on the human respiratory system. *Journal of Thoracic Disease*, (2016). 8(1), E69–E74.

YOKOTA, S., MIZUO, K., MORIYA, N., OSHIO, S., SUGAWARA, I., & TAKEDA, K. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neuroscience Letters*, (2009). 449(1), 38–41.

YOKOTA, S., MORIYA, N., IWATA, M., UMEZAWA, M., OSHIO, S., & TAKEDA, K. K. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *Journal of Toxicological Sciences*, (2013). 38(1), 13–23.

YOKOTA, S., SATO, A., UMEZAWA, M., OSHIO, S., & TAKEDA, K. In utero exposure of mice to diesel exhaust particles affects spatial learning and memory with reduced N-methyl-d-aspartate receptor expression in the hippocampus of male offspring. *NeuroToxicology*, (2015). 50, 108–115.

YOKOTA S., OSHIO S., MORIYA N., TAKEDA K. Social Isolation-Induced Territorial Aggression in Male Offspring Is Enhanced by Exposure to Diesel Exhaust during Pregnancy, PLOS ONE, 2016, DOI :10.1371.

YOSHIZAKI, K., BRITO, J. M., MORIYA, H. T., TOLEDO, A. C., FERZILAN, S., LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P., ... MACCHIONE, M. Chronic exposure of diesel exhaust particles induces alveolar enlargement in mice. *Respiratory Research*, (2015). 16(1), 1–10.

ZIELINSKA B., SAGEBIEL J., ARNOTT W.P., ROGERS C.F., KELLY K.E., WAGNER D.A., LIGHTY J.S., SAROFIM A.F. & PALMER G. Phase and size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel and gasoline vehicle emissions. *Environ Sci Technol* 38, (2004), 2557-67.

Sitographie :

Avis de l'ANSES : Pollution par les particules dans l'air ambiant : synthèse des éléments sanitaires en vue d'un appui à l'élaboration de seuil d'information et d'alerte du public pour les particules dans l'air ambiant (en ligne). ANSES, 2009 (consulté le 30/08/2019). Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2007et0006Ra.pdf>

Communiqué de presse : 7 millions de décès prématurés sont liés à la pollution de l'air chaque année (en ligne). OMS, 2014 (consulté le 30/08/2019). Disponible sur <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/fr/>

Rapport : Impacts de l'exposition chronique aux particules fines sur la mortalité en France continentale et analyse des gains en santé de plusieurs scénarios de réduction de la pollution atmosphérique (en ligne). Santé Publique France, 2016 (consulté le 30/08/2019). Disponible sur : https://www.google.fr/?client=safari&channel=iphone_bm&gws_rd=cr&ei=cfo8WfzeJlraOmosKgC#channel=iphone_bm&q=Impacts+de+l'exposition+chronique+aux+particules+fines+sur+la+mortalité+en+France+continentale+et+analyse+des+gains+en+santé+de+plusieurs+scénarios+de+réduction+de+la+pollution+atmosphérique

Rapport : Surveillance et information sur la Qualité de l'Air en Ile-de-France – Bilan année 2015 (en ligne). AirParif Association, 2015 (consulté le 30/08/2019) Disponible sur https://www.airparif.asso.fr/_pdf/publications/2015.pdf

Rapport : Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air : particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre (en ligne). OMS, 2005 (consulté le 30/08/2019) Disponible sur : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69476/1/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_fre.pdf

Rapport: Review of evidence on health aspects of air pollution (en ligne). OMS, 2013 (consulté le 30/08/2019). Disponible sur : http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/193108/REVIHAAP-Final-technical-report-final-version.pdf?ua=1

Site : Évolution du parc et des immatriculations entre essence et diesel (en ligne). Fiches-auto, 2017 (consulté le 30/08/2019) Disponible sur : <http://www.fiches-auto.fr/articles-auto/l-auto-en-chiffres/s-891-immatriculations-essence-diesel.php>

Site : Food and Agriculture Organization of the United Nations : Les impacts de l'élevage sur l'environnement (en ligne). 2006 (consulté le 30/08/2019) <http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0612sp1.htm>

Site : Energenics annonce le succès des essais d'additifs de carburant d'Enercat (en ligne). Energenics, (2016) (consulté le 30/08/2019) Disponible sur : <http://www.prnewswire.fr/news-releases/energenics-annonce-le-succes-des-essais-dadditifs-de-carburant-denercat-155382745.html>.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 18 septembre 2019

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Benoit OLIVIER</p> <p><u>Sujet</u> : la neurotoxicologie développementale suite à une exposition gestationnelle aux particules de fumées de diesel chez le lapin" : caractérisation des effets sur l'activité de la cytochrome oxydase et l'acétylcholinestérase en tant que marqueurs de la fonctionnalité cérébrale.</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. Olivier JOUBERT, Maître de conférences Directeur : M. Henri SCHROEDER, Maître de conférences, HDR Juges : M. François DUPUIS, Maître de conférences M. Laurent GATE, Responsable Laboratoire CMR</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 26 juin 2019</p> <p>Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p>M. Olivier JOUBERT M. Henri SCHROEDER</p> <p> </p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 20.08.2019</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center"> Pr. Raphaël DUYVAL</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 27 AOÛT 2019</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center"> Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 10803</p>

N° d'identification : 10803

TITRE

Neurotoxicologie développementale de l'exposition gestationnelle aux particules de fumées de diesel chez le lapin : caractérisation de effets sur l'activité de la cytochrome oxydase et de l'acétylcholinestérase en tant que marqueurs de la fonctionnalité cérébrale

Thèse soutenue le 18 septembre 2019
Par Benoit OLIVIER

RESUME :

La pollution atmosphérique, et particulièrement celle liée aux particules fines issues de moteur diesel (PFD ; < 100 nm), est une préoccupation majeure de santé publique du fait que cette dernière peut gagner la voie systémique et atteindre divers organes, dont le cerveau.

Si la plupart des données neurotoxiques a été obtenue suite à une exposition directe de l'individu que ce soit lors de la période post-natale ou à l'âge adulte, des études récentes tant épidémiologiques qu'expérimentales suggèrent que l'exposition gestationnelle aux PFD semble être associée à différentes altérations cérébrales anatomiques et fonctionnelles au niveau de la descendance.

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets d'une exposition gestationnelle répétée et contrôlée aux PFD chez le lapin sur l'activité cérébrale via les mesures histochimiques de l'activité de la cytochrome oxydase et de l'acétylcholine estérase (AchE) dans différentes régions cérébrales à l'âge adulte. L'ensemble des résultats obtenus chez l'adulte montrent que l'exposition gestationnelle aux particules de diesel induit des modifications fonctionnelles cérébrales à long terme avec une sensibilité particulière du système dopaminergique, plus particulièrement au niveau des structures limbiques.

MOTS CLES : pollution atmosphérique, particules de fumées de diesel, exposition gestationnelle, activité neuronale, cytochrome oxydase, acétylcholinestérase, lapin

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
M. Olivier JOUBERT	Maître de Conférences en Toxicologie	Expérimentale	<input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique	<input type="checkbox"/>
M. Henri SCHROEDER	Maître de Conférences habilité à diriger des recherches	Thème	<input type="checkbox"/>

Thèmes	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament 5 - Biologie	② Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
--------	--	---