

Etude des conséquences neurotoxiques d'une exposition prénatale au chlorpyrifos chez deux espèces de rongeur et de liens possibles avec les troubles neurodéveloppementaux

Agnès PETIT-PAITEL | paitel@ipmc.cnrs.fr

CNRS, Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire - UMR7275, Valbonne

Mots clés : **Autisme, cerveau, chlorpyrifos, développement, inflammation, insecticide, neurotoxicité, organophosphoré, pesticides, stress oxydatif**

Le chlorpyrifos (CPF) est un pesticide organophosphoré (OPP)* à usage agricole. On le retrouve aussi dans les insecticides à usage domestique dans les pays qui n'en ont pas encore interdit l'usage (la France a interdit l'usage domestique depuis 1995). Le CPF est un neurotoxique* reconnu, inhibiteur des cholinestérases* : l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Une exposition aiguë au CPF entraîne une accumulation de l'acétylcholine (ACh)* au niveau des systèmes nerveux central et périphérique pouvant causer une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques à l'origine d'une détresse respiratoire aiguë, de perturbations cardiovasculaires et de troubles neurologiques (1). Les effets d'une exposition chronique à faibles doses sont moins connus. Chez l'homme, des études ont prouvé la toxicité du CPF sur le développement cérébral (2). Le CPF augmenterait la prévalence des déficits cognitifs chez les enfants exposés pendant le développement embryonnaire, surtout les garçons (3). Dans la première étude, les auteurs montrent la pertinence de l'utilisation du cobaye, dont le développement cérébral est plus proche de celui de l'homme que du rat ou de la souris (4), comme modèle d'étude de la toxicité prénatale du CPF. L'exposition *in utero* produit chez les mâles pré-pubères des déficits de mémorisation et d'apprentissage spatiaux. Dans la seconde étude, les auteurs étudient les effets d'une exposition prénatale au CPF sur une lignée de souris présentant des comportements mimant ceux de l'autisme chez l'Homme et montrent la sensibilité accrue de ces souris vis-à-vis du stress oxydatif* et de l'inflammation induits par le CPF.

Défauts d'apprentissage spatial chez les cobayes pré-pubères exposés *in utero* au pesticide organophosphoré chlorpyrifos : implications toxicologiques.

Mamczarz J. et al. (2016). Spatial learning impairment in prepubertal guinea pigs prenatally exposed to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos: Toxicological implications. *Neurotoxicology*, vol.23 (3): p.203-21.

Résumé

Cinq ans après son interdiction à des fins domestiques, le CPF était toujours détecté dans une grande majorité de foyers américains (5). Les effets neurotoxiques du CPF sur le cerveau humain en développement sont responsables de faibles poids et taille à la naissance (6), ainsi que de déficits moteurs et cognitifs chez les jeunes enfants exposés *in utero* (7). Ici, les auteurs ont exposé des femelles cobayes gestantes à des doses subaiguës de CPF (25mg/kg/jour, en injection sous-cutanée, pendant 10 jours) durant la période cible du développement cérébral des embryons (à partir du jour 53-55 de gestation, et pendant 10 jours consécutifs). On observe une réduction de l'activité de la BChE plasmatique et cérébrale chez les mères et leurs petits, sans causer de signes cliniques de toxicité aiguë. En revanche, l'inhibition de l'activité de l'AChE est observée chez la descendance dans les hématies*, mais pas sur l'activité AChE cérébrale. Au

stade pré-pubère, les performances motrices et mnésiques de la descendance sont testées. L'exposition prénatale au CPF réduit la prise de poids de la descendance femelle uniquement. Elle n'affecte pas les performances des animaux dans le test du champ-ouvert* (distance parcourue, nombre d'entrées et temps passé dans le centre avec ou sans nouvel objet). En revanche, l'exposition prénatale au CPF diminue les performances des mâles dans le test de la piscine de Morris* (augmentation de la latence pour trouver la plateforme et de la distance parcourue) sans affecter les performances locomotrices ni le thigmotactisme*. Les résultats de cette étude montrent que l'exposition prénatale au CPF induit des défauts d'apprentissage et de mémoire spatiaux uniquement chez les mâles pré-pubères, ce qui est en accord avec les études épidémiologiques.

Commentaire

L'originalité de cette étude réside dans le choix du modèle animal : le cobaye. Contrairement aux autres rongeurs communément utilisés en recherche (rats et souris), cet animal a une longue période de gestation (2 mois), un cerveau « mature » à la naissance et une structure placentaire proche de celle de l'Homme (4). De plus, le mode d'administration du CPF choisi par les auteurs permet d'obtenir un taux d'inhibition de l'activité de l'AChE dans les hématies similaire à celui constaté chez les travailleurs

agricoles (8). Les auteurs reproduisent dans ce modèle les effets neurotoxiques comportementaux observés chez l'Homme, à savoir des déficits cognitifs liés à l'apprentissage et la mémoire spatiaux, plus marqués pour le sexe masculin que féminin (9). Ce modèle s'avère donc très intéressant pour des études futures sur la neurotoxicité du CPF et la recherche de thérapies. D'un point de vue méthodologique, le retrait de 7 animaux incapables de nager (dont 2 contrôles et 5 exposés au CPF) n'est pas suffisamment expliqué et justifié dans la publication. En effet, il a été montré que des souris exposées *in utero* au CPF pouvaient présenter une maturation et une coordination motrices retardées (10).

L'exposition prénatale à l'insecticide organophosphoré chlorpyrifos augmente le stress oxydatif cérébral et la synthèse de prostaglandine E₂ dans un modèle murin d'autisme idiopathique.

De Felice A. et al. (2016). Prenatal exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos enhances brain oxidative stress and prostaglandin E₂ synthesis in a mouse model of idiopathic autism. *J. of Neuroinflammation*, vol.13: p.149-168

Résumé

Les troubles du spectre autistique (TSA)* ont une origine complexe avec l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux (11). En dehors de leur action sur les cholinestérases, les pesticides OPP induiraient un stress oxydant* à l'origine de la peroxydation de certains lipides*. Ceci génère des métabolites, dont le 15-F_{2t}-ISO_P, qui est un indicateur *in vivo* du stress oxydant et le médiateur lipidique PGE₂, impliqué dans l'inflammation (14). Les souris BTBR T+tf/J présentent de nombreux traits comportementaux mimant ceux de l'autisme chez l'Homme, comme des problèmes de sociabilité et de communication et des comportements stéréotypés (15). Chez ces souris comme chez les enfants autistes, on retrouve des altérations immunologiques avec en particulier une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires (16). Les liens entre altérations du système immunitaire et les déficits comportementaux dans les TSA ne sont pas clairement connus. Dans cette étude, les auteurs montrent qu'à la naissance, le niveau de 15-F_{2t}-ISO_P est plus élevé dans le cerveau des souriceaux BTBR que chez les souriceaux nés de femelles gestantes du groupe contrôle, souris C57BL6 (« non autistes »). Les auteurs administrent du CPF à des doses subtoxiques (6mg/kg) à des femelles gestantes C57BL6 ou BTBR, par gavage oral, du 14^{ème} au 17^{ème} jour de gestation. Ceci n'affecte pas la durée de la gestation, la prise de poids des femelles gestantes, le poids et la viabilité des petits à la naissance. A la naissance, les niveaux cérébraux de 15-F_{2t}-ISO_P et de PGE₂ sont plus élevés chez les souriceaux BTBR exposés au CPF que chez les souriceaux C57BL6. Le CPF prénatal n'a pas d'effet sur les taux cérébraux de 15-F_{2t}-ISO_P et de PGE₂ chez les souris C57BL6 alors qu'il les augmente (à la naissance et au sevrage pour le 15-F_{2t}-ISO_P, uniquement au sevrage pour le PGE₂) chez les souris BTBR. Le 21^{ème} jour post-natal (PND21), qui correspond à l'adolescence chez l'Homme, est une période de réorganisation neuronale

majeure. A cette période, les 2 métabolites (15-F_{2t}-ISO_P et de PGE₂) sont spécifiquement augmentés chez les mâles BTBR. A l'âge adulte (70 jrs post-naissance), seul le PGE₂ reste significativement élevé chez les souris BTBR. En conclusion, les auteurs montrent ici qu'il existe une forte interaction entre la lignée de souris étudiée (BTBR, qui présente un comportement autistique) et l'effet du traitement prénatal au CPF vis-à-vis des taux cérébraux de 15-F_{2t}-ISO_P et de PGE₂, suggérant une vulnérabilité sélective des cerveaux « autistes » face au stress oxydant et aux altérations immunitaires induites par le CPF (17).

Commentaire

Cette étude intéressante prouve que l'induction du stress oxydant est un élément de la toxicité chronique des OP. En effet, la dose de CPF administrée n'inhibe pas l'AChE, et permet donc de mettre en évidence de nouveaux mécanismes de toxicité (18). La lignée de souris BTBR est un modèle de choix pour étudier les comportements liés à l'autisme. Bien que les auteurs ne corrèlent pas leurs observations à des études comportementale et histologique, ils suggèrent que l'augmentation du PGE₂ en réponse au CPF pourrait être impliquée dans des défauts neurodéveloppementaux observés chez les souris BTBR, comme la réduction de l'épaisseur du cortex (19). L'augmentation de 15-F_{2t}-ISO_P et de PGE₂ pourrait également être liée aux déficits cognitifs des souris BTBR. Un autre point intéressant est que les effets du CPF prénatal sont plus importants chez les souriceaux mâles que chez les femelles, ce qui est en accord avec les études épidémiologiques. Globalement, cette étude suggère que les perturbations du système immunitaire chez des personnes souffrant de TSA, pourraient engendrer une vulnérabilité accrue au stress oxydant produit par certains polluants, comme le CPF, ce qui amplifierait les effets néfastes sur les neurones. Cette hypothèse expliquerait la contribution environnementale dans le risque autistique.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Malgré l'interdiction de son usage domestique, le CPF est encore largement présent dans l'environnement. En effet, cette molécule entre dans la composition de plusieurs produits largement utilisés dans l'agriculture en France, préconisés notamment pour traiter les abricotiers, les crucifères oléagineuses (colza), pêchers, poiriers, pommiers et vignes. Nous sommes donc potentiellement tous exposés à de faibles doses de ce composé neurotoxique. L'exposition *in utero* au CPF favoriserait l'apparition de troubles neurodéveloppementaux tels que l'autisme, en particulier chez les garçons. Les deux publications sélectionnées démontrent l'impact neurotoxique de l'exposition prénatale à des doses subtoxiques de CPF sur deux espèces différentes de rongeurs. La seconde publication met en évidence des interactions entre facteurs génétiques et environnementaux pour expliquer l'influence que pourrait avoir le CPF dans les troubles autistiques.

GENERAL CONCLUSION

Despite the interdiction of domestic use, the CPF is still widely present in the environment. Indeed, this molecule is part of the composition of several products widely used in agriculture in France, recommended in particular to treat apricot, colza, peach, pear, apple and vine. We are all potentially exposed to low doses of this neurotoxic compound. In utero exposure to CPF would promote the emergence of neurodevelopmental disorders such as autism, particularly in boys. The two selected articles demonstrate the neurotoxic effects of prenatal exposure to subtoxic doses of CPF on two species of rodent. The second highlights the interactions between genetic and environmental factors to explain the influence that could have the CPF in autistic disorders.

Lexique

Acétylcholine (ACh): Neurotransmetteur qui transmet l'information d'un neurone à un autre et permet la propagation d'un potentiel d'action (influx électrique) dans le système nerveux. En périphérie, l'ACh a pour principaux effets une dilatation des artères, une contraction des bronches et du tube digestif et une sécrétion de mucus par les bronches. Dans le cerveau, l'ACh aurait plusieurs fonctions dont la régulation de la motricité, perturbée dans la maladie de Parkinson, ou la mémoire, perturbée dans la maladie d'Alzheimer.

Cholinestérase : Enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique. Cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation. Il existe deux types de cholinestérases, distinguées par leur affinité pour l'acétylcholine et la butyrylcholine: l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ou cholinestérase plasmatique.

Hématies : Globules rouges.

Neurotoxicité : Toxicité au niveau des neurones.

Organophosphoré (OPP): Qualifie une molécule organique de synthèse (notamment certains insecticides) qui contient au moins un atome de phosphore. Plus biodégradables et d'action plus spécifique que les organochlorés, les OPP leur sont préférés malgré leur coût supérieur.

Peroxydation lipidique : Phénomène d'oxydation des lipides insaturés qui se produit *in vitro* (à l'origine du rancissement des aliments) et *in vivo* selon un même mécanisme. *In vivo*, cette oxydation est responsable de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation.

Stress oxydatif/oxydant : Conséquence du fonctionnement cellulaire des organismes qui consomment de l'oxygène, aboutissant à la production de radicaux libres. En cas d'excès, il peut devenir dommageable et causer inflammation et dommages de l'ADN favorisant la survenue de cancers ou de maladies neurodégénératives par exemple.

Test du champ ouvert (open-field) : Test comportemental permettant d'estimer le comportement exploratoire et l'activité générale chez les rongeurs. L'animal est placé dans

une enceinte, généralement carrée, rectangulaire ou de forme circulaire avec des murs qui empêchent toute évasion. La distance parcourue, le temps passé en mouvement, les redressements et le changement de l'activité au fil du temps sont parmi les nombreuses mesures qui peuvent être relevées. Certains résultats, en particulier la défécation, le temps passé au centre de l'enceinte et l'activité exploratoire dans les cinq premières minutes du test servent également à estimer certains aspects de l'émotivité, y compris l'anxiété. Un objet peut aussi être placé au centre de l'enceinte afin de fournir à l'animal la possibilité d'explorer un nouvel objet dans un contexte environnemental familier.

Test de la piscine de Morris : Test comportemental visant à étudier, chez les rongeurs, les capacités à mémoriser et à gérer de l'information spatiale dans une situation aversive. Ce test repose sur la tendance naturelle d'un animal à tenter de sortir d'un environnement stressant et confiné dans lequel il est placé. Typiquement, il s'agit d'un bassin rond, rempli d'eau laiteuse, comportant une plate-forme immergée donc invisible. L'animal est déposé dans l'eau et nage jusqu'à ce qu'il trouve, d'abord par hasard, la plate-forme. L'expérience est répétée plusieurs fois par jour, plusieurs jours de suite. L'animal met de moins en moins de temps à trouver la plate-forme en s'aidant de repères visuels placés autour du bassin. Après l'apprentissage, des essais dans lesquels la plate-forme est supprimée sont effectués. L'animal, s'il se souvient de l'emplacement initial de la plateforme, passera plus de temps dans la zone où elle se trouvait. Ce test permet d'étudier la mémoire de travail et la mémoire spatiale.

Thigmotactisme : Déplacement d'un organisme vivant pour venir en contact avec un élément de son environnement et y rester longtemps. Initialement utilisé pour décrire les poissons restant en contact avec les roches. Ici, désigne la tendance des rongeurs à nager près des parois du bassin, dans la piscine de Morris.

Troubles du spectre autistique (TSA) : Regroupent les désordres neurologiques qui étaient connus sous les noms d'autisme, de syndrome d'Asperger, de trouble envahissant du développement non spécifié et de trouble désintégratif de l'enfance.

Publications de référence

1 Aldridge JE, Meyer A, Seidler FJ, et al. Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1027-31.

2 Rauh VA, Perera FP, Horton MK, et al. Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:7871-6.

3 Horton MK, Kahn LG, Perera F, et al. Does the home environment and the sex of the child modify the adverse effects of prenatal exposure to chlorpyrifos on child working memory? *Neurotoxicol Teratol* 2012;34:534-41.

4 Dobbing J, Sands J. Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. *Brain Res* 1970;17:115-23.

5 Stout DM, 2nd, Bradham KD, Egeghy PP, et al. American Healthy Homes Survey: a national study of residential

pesticides measured from floor wipes. *Environ Sci Technol* 2009;43:4294-300.

6 Zhao Q, Gadagbui B, Dourson M. Lower birth weight as a critical effect of chlorpyrifos: a comparison of human and animal data. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005;42:55-63.

7 Rauh V, Arunajadai S, Horton M, et al. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect* 2011;119:1196-201.

8 Ames RG, Brown SK, Mengle DC, et al. Cholinesterase activity depression among California agricultural pesticide applicators. *Am J Ind Med* 1989;15:143-50.

9 Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;121:179-87.

10 De Felice A, Scattoni ML, Ricceri L, et al. Prenatal exposure to a common organophosphate insecticide delays motor development in a mouse model of idiopathic autism. *PLoS One* 2015;10:e0121663.

11 Wong CT, Wais J, Crawford DA. Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing autism spectrum disorders. *Eur J Neurosci* 2015;42:2742-60.

12 Gultekin F, Ozturk M, Akdogan M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Arch Toxicol* 2000;74:533-8.

13 Romanazzi V, Pirro V, Bellisario V, et al. 15-F(2)t isoprostane as biomarker of oxidative stress induced by tobacco smoke and occupational exposure to formaldehyde in workers of plastic laminates. *Sci Total Environ* 2013;442:20-5.

14 Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:986-1000.

15 McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, et al. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav* 2008;7:152-63.

16 Careaga M, Schwartz J, Ashwood P. Inflammatory profiles in the BTBR mouse: how relevant are they to autism spectrum disorders? *Brain Behav Immun* 2015;43:11-6.

17 Benno R, Smirnova Y, Vera S, et al. Exaggerated responses to stress in the BTBR T+tf/J mouse: an unusual behavioral phenotype. *Behav Brain Res* 2009;197:462-5.

18 Terry AV, Jr. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol Ther* 2012;134:355-65.

19 Doderio L, Damiano M, Galbusera A, et al. Neuroimaging evidence of major morpho-anatomical and functional abnormalities in the BTBR T+TF/J mouse model of autism. *PLoS One* 2013;8:e76655.

Autres publications identifiées

Mullen AR, Ross B, Chou JW, Khankan R, Khialeeva E, Bui K, Carpenter EM. A complex interaction between reduced reelin expression and prenatal organophosphate exposure alters neuronal cell morphology. *ASN Neuro* 2016; 8.

Lam J, Sutton P, Kalkbrenner A, Windham G, Halladay A, Kostas E, Lawler C, Davidson L, Daniels N, Newschaffer C, Woodruff T. A systematic review and meta-analysis of multiple airborne pollutants and autism spectrum disorder. *PLoS One* 2016; 21;11(9):e0161851.

Sindi RA, Harris W, Arnott G, Flaskos J, Lloyd Smith C, Hargreaves AJ. Chlorpyrifos- and chlorpyrifos oxon-induced neurite retraction in pre-differentiated N2a cells is associated with transient hyperphosphorylation of neurofilament heavy chain and ERK ½. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;308:20-31.

Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.