



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-theses-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>



SIReNa



calbinotox
composés alimentaires
biofonctionnalités
et risques neurotoxiques



THÈSE

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité Sciences Agronomiques

par **Estefanía BERNAL MELÉNDEZ**

le 27 Mars 2018

TOXICITE NEURO-DEVELOPPEMENTALE D'UNE EXPOSITION GESTATIONNELLE A LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE.

**EFFETS A COURT ET A LONG TERME DE L'INHALATION REPETEE DE
PARTICULES DE FUMEEES DE DIESEL CHEZ LE LAPIN.**

Directeurs de thèse : **Christine BALY** et **Henri SCHROEDER**

Jury

Mme. Anna BENCSIK, Directeur de Recherche, ANSES, Lyon

M. Alain TREMBLEAU, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Mme. Sylvie GRANON, Professeur, Université Paris Saclay, Orsay

Mme. Christine BALY, Directeur de Recherche, INRA – NBO, Jouy en Josas

Mr. Henri SCHROEDER, Maître de conférences, HDR, Université de Lorraine, Nancy

Mme. Hélène DESQUEYROUX, Ingénieur de recherche, ADEME, Paris

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-directeur

Co-directeur

Invité

Neurobiologie de l'olfaction (NBO)

Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

78350 Jouy-en-Josas, Cedex

FRANCE

Unité de Recherche « Composés Alimentaires : Biofonctionnalités et Risques Neurotoxiques » (Calbinotox)

Université de Lorraine – EA 7488

Faculté des Sciences et Technologies - B.P. 70239

54506 VANDŒUVRE-LÈS-NANCY Cedex

FRANCE

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'Energie (ADEME)

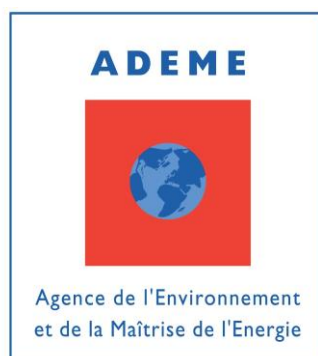


Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des illustrations

SECTION INTRODUCTIVE 1

Partie I – La matière particulaire s'avère être un des polluants majeurs de l'air avec un impact sanitaire significatif

1. La pollution atmosphérique est un mélange complexe de matières particulaires, de gaz et de composés organiques	3
1.1. Composition de la pollution atmosphérique	3
1.1.1. La fraction particulaire ou PM (Particulate Matter)	4
1.1.2. La fraction gazeuse	5
1.2. Sources de la pollution atmosphérique	5
1.2.1. Le trafic routier	5
1.2.2. L'énergie fossile et les activités industrielles	6
2. Les moteurs diesel sont sources d'une pollution particulaire questionnée pour sa toxicité	7
2.1. Composition des gaz d'échappement de moteur diesel	7
2.2. Risques particuliers liés au diesel	8
3. La pollution atmosphérique est un enjeu de santé publique	10
3.1. Réglementations et recommandations d'émission	10
3.1.1. A l'échelle mondiale	10
3.1.2. A l'échelle européenne et française	10
3.2. Enjeux sanitaires et environnementaux	11
3.2.1. Risques sanitaires liés à l'exposition	11
3.2.2. Objectifs et actions pour limiter les rejets polluants dans l'air	12

Partie II – La pollution de l'air pourrait endommager le cerveau de l'enfant avant même sa naissance

1. Etudes sur cohortes humaines	15
1.1. Conséquences d'une exposition chronique directe à la pollution de l'air	15
1.2. Conséquences d'une exposition maternelle à la pollution de l'air sur la descendance	18

1.3. La caractérisation de l'exposition maternelle aux polluants atmosphériques reste complexe	20
<i>1.3.1. Facteurs de variation individuelle</i>	20
<i>1.3.2. Nature et réactivité des particules</i>	21
<i>1.3.3. Doses d'exposition</i>	21
<i>1.3.2. Effets cocktail</i>	21
2. Etudes sur modèles animaux	23
2.1. Conséquences d'une exposition répétée contrôlée aux particules de fumées de diesel sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu	23
<i>2.1.1. Après la naissance</i>	23
<i>2.1.2. En période gestationnelle</i>	24
2.2. Précautions à prendre dans l'examen des effets neurotoxiques issus de l'exposition gestationnelle aux particules	26
<i>2.2.1. Les conditions d'exposition rendent difficiles les comparaisons entre les données publiées</i>	26
<i>2.2.2. Une attention particulière doit être portée au modèle animal utilisé lors de l'étude de l'exposition gestationnelle aux PFD</i>	27
<u>2.2.2.1. La maturation cérébrale diffère selon les espèces</u>	27
<u>2.2.2.2. Les échanges fœto-placentaires dépendent de la structure</u>	28

Partie III – Le continuum anatomo-fonctionnel entre le système olfactif et le cerveau : le lien entre environnement et SNC

1. Les particules inhalées peuvent atteindre directement le cerveau par voie systémique et olfactive	31
1.1. Transfert particulaire vers le SNC via la BHE	32
<i>1.1.1. La voie systémique liée à la barrière hémato-encéphalique</i>	32
<i>1.1.2. La réponse immunitaire périphérique liée aux particules endommage la BHE et peut altérer le fonctionnement neuronal</i>	33
1.2. Transfert particulaire vers le SNC via le système olfactif	34
1.2.1. Le système olfactif	34
<u>1.2.1.1. Les neurones sensoriels olfactifs : siège de la transduction du stimulus olfactif</u>	34
<u>1.2.1.2. Connectivité entre l'épithélium et le bulbe olfactif</u>	35
1.2.2. Synaptologie du système olfactif	36
<u>1.2.2.1. Synaptologie Glomérulaire</u>	36
<u>1.2.2.2. Synaptologie Granulaire</u>	37
<u>1.2.2.3. Projections centripètes et centrifuges du bulbe olfactif</u>	37
<i>1.2.2.3.1. Les projections centripètes du bulbe olfactif</i>	37
<i>1.2.2.3.2. Les projections centrifuges du bulbe olfactif</i>	39
1.2.3. Les particules inhalées peuvent atteindre directement le SNC par voie olfactive et participer à des dysfonctionnements neuronaux	40

1.3. Le fœtus pourrait être exposé aux particules par voie systémique et olfactive au cours du développement	41
2. Les dysfonctionnements olfactifs pourraient être considérés comme indicateurs précoces de neuropathologies dans des régions plus centrales	43

OBJECTIFS DE THESE	45
---------------------------	-----------

SECTION METHODOLOGIQUE	50
-------------------------------	-----------

Partie I – Expérimentation animale	
---	--

1. Procédure expérimentale d'exposition	52
1.1. Le choix du lapin comme modèle expérimental.....	52
1.2. Animaux	52
1.3. Matériel et <i>conditions d'exposition mis en place</i>	52
2. Démarche expérimentale	54
2.1. Plan de reproduction et séries d'étude.....	54
2.2. Procédure expérimentale et collecte des tissus d'intérêt.....	54

Partie II – Exploration comportementale de la fonction olfactive	
---	--

1. Analyse de la sensibilité olfactive chez le lapereau	57
1.1. La réponse du lapereau à la phéromone mammaire.....	57
1.2. Test de reconnaissance à la phéromone mammaire 2MB2.....	57
2. Analyse de la discrimination olfactive chez le lapin adulte	59
2.1. Principe du test.....	59
2.2. Procédure expérimentale.....	59

Partie III – Analyse structurale et ultrastructurale du système olfactif <i>via</i> la MET	
---	--

1. Principe de la microscopie électronique à transmission	62
2. Préparation des tissus d'intérêt et réalisation des coupes	64
2.1. Préparation des tissus d'intérêt.....	64
2.2. Réalisation des coupes semi-fines.....	64
2.3. Réalisation des coupes ultrafines.....	65

Partie IV – Exploration de fonctions cérébrales et olfactives

1. Prélèvement des tissus d'intérêt	67
1.1. <i>Prélèvement des tissus olfactifs</i>	67
1.2. <i>Prélèvement des tissus centraux</i>	67
1.2.1. <i>Prélèvement des tissus centraux fœtaux</i>	67
1.2.2. <i>Prélèvement des tissus centraux adultes</i>	68
2. Quantification des taux de monoamines par HPLC	69
2.1. <i>Principe de l'HPLC</i>	69
2.2. <i>Dosage des monoamines</i>	70
3. Analyse histologique des systèmes 5-HT et DA	71
3.1. <i>Procédure de marquage et quantification des tissus bulbaires</i>	71
3.1.1. <i>Marquage des tissus</i>	71
3.1.2. <i>Semi-quantification de l'immunomarquage tissulaire de la TH</i>	71
3.2. <i>Procédure de marquage et quantification des voies centrales</i>	72
3.2.1. <i>Marquage des tissus</i>	72
3.2.2. <i>Semi-quantification de l'intensité du marquage des tissus</i>	73
4. Étude de la réponse apoptotique via la technique TUNEL	74
4.1. <i>Principe du TUNEL</i>	74
4.2. <i>Procédure de marquage et analyse des tissus bulbaires</i>	74
4.2.1. <i>Marquage des tissus</i>	74
4.2.2. <i>Analyse des tissus marqués au TUNEL</i>	75
5. Analyse de l'activité cholinergique cérébrale	76
5.1. <i>Principe de l'analyse histochimique via l'AChE</i>	76
5.2. <i>Analyse des tissus marqués à l'AChE</i>	76
5.2.1. <i>Marquage des tissus</i>	76
5.2.2. <i>Quantification de l'activité de l'AChE</i>	77
6. Analyse de l'activité métabolique neuronale via la CO	78
6.1. <i>Principe de l'analyse histochimique via la cytochrome oxydase</i>	78
6.2. <i>Analyse des tissus d'intérêt marqués à la CO</i>	78
6.2.1. <i>Marquage des tissus</i>	78
6.2.2. <i>Quantification de l'activité CO</i>	79

7. Exploitation statistique des données	80
7.1. Analyse statistique des données comportementales	80
7.2. Analyse statistique des données expérimentales	80

SECTION EXPERIMENTALE **81**

Partie I – Effets neurotoxiques à court terme d’une exposition gestationnelle répétée aux particules de fumée de diesel

1. Étude des effets de l'exposition aux PFD sur le système olfactif fœtal et le comportement olfactif à court terme	83
1.1. Analyse du poids des bulbes olfactifs	83
1.2. Étude structurale et ultrastructurale des tissus olfactifs	83
<i>1.2.1. Analyse structurale et ultrastructurale de la muqueuse olfactive</i>	83
<i>1.2.2. Analyse structurale et ultrastructurale du bulbe olfactif</i>	84
<i>1.2.3. Mise en évidence de la présence de dépôt particulaires au niveau du système olfactif</i>	85
1.3. Analyse de la neuromodulation au niveau du système olfactif	86
<i>1.3.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique</i>	86
<u>1.3.1.1. Approche neurochimique</u>	86
<u>1.3.1.2. Approche immunohistochimique</u>	86
<i>1.3.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique</i>	87
<u>1.3.2.1. Approche neurochimique</u>	87
<u>1.3.2.2. Approche immunohistochimique</u>	87
<i>1.3.3 Étude de la neuromodulation noradrénergique</i>	88
1.4. Étude immunohistochimique du niveau d’apoptose bulbaire	88
1.5. Analyse de la sensibilité olfactive chez les lapereaux à PND2	89
2. Étude des effets de l'exposition aux PFD sur le système nerveux central du fœtus	91
2.1. Analyse du poids corporel et du poids des cerveaux	91
2.2. Analyse de la neuromodulation au niveau du système nerveux central	91
<i>2.2.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique</i>	92
<u>2.2.1.1. Approche neurochimique</u>	93
<u>2.2.1.2. Approche immunohistochimique</u>	94
<i>2.2.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique</i>	96
<u>2.2.2.1. Approche neurochimique</u>	96
<u>2.2.2.2. Approche immunohistochimique</u>	96
<i>2.2.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique</i>	98

Partie II – Effets neurotoxiques à long terme d'une exposition gestationnelle répétée aux particules de fumée de diesel

1. Étude sur le système olfactif et le comportement olfactif à long terme	100
1.1. Analyse de la discrimination olfactive chez le mâle	100
1.1.1. Analyse de la discrimination olfactive à PND118 en condition standard d'élevage	100
1.1.1.1. <u>Activité locomotrice et préférence de place</u>	100
1.1.1.2. <u>Exploration et reniflage des boules à thé</u>	100
1.1.2. Analyse des performances olfactives à PND118 suite à un jeûne modéré de 16H	101
1.1.2.1. <u>Activité locomotrice et préférence de place</u>	101
1.1.2.2. <u>Exploration et reniflage des boules à thé</u>	102
1.1.2.3. <u>Effets de la mise à jeun sur les performances olfactives des animaux</u>	102
1.1.3. Analyse de la discrimination olfactive à PND190 en condition standard d'élevage	103
1.1.3.1. <u>Activité locomotrice et préférence de place</u>	103
1.1.3.2. <u>Exploration et reniflage des boules à thé</u>	104
1.1.4. Analyse de la discrimination olfactive à PND190 suite à un jeûne modéré de 16H	104
1.1.4.1. <u>Activité locomotrice et préférence de place</u>	104
1.1.4.2. <u>Exploration et reniflage des boules à thé</u>	104
1.1.4.3. <u>Effets de la mise à jeun sur les performances olfactives des animaux</u>	105
1.2. Analyse du poids des bulbes olfactifs	106
1.3. Analyse de la neuromodulation monoaminergique au niveau olfactif	106
1.3.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique	106
1.3.1.1. <u>Approche neurochimique</u>	106
1.3.1.1. <u>Approche immunohistochimique</u>	107
1.3.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique	108
1.3.2.1. <u>Approche neurochimique</u>	108
1.3.2.2. <u>Approche immunohistochimique</u>	109
1.3.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique	109
2. Étude sur le système nerveux central des adultes	110
2.1. Analyse du poids corporel et du poids des cerveaux des adultes F1	110
2.2. Analyse de la neuromodulation au niveau central	110
2.2.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique	110
2.2.1.1. <u>Approche neurochimique</u>	110
2.2.1.2. <u>Approche immunohistochimique</u>	112

2.2.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique	113
2.2.2.1. Approche neurochimique	113
2.2.2.2. Approche neurochimique	114
2.2.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique	114
2.2.4. Étude histochimique des activités régionales de l'acétylcholinestérase et la cytochrome oxydase	116
2.2.4.1. Acétylcholinestérase	116
2.2.4.1. Cytochrome oxydase	117

SECTION CONCLUSIVE **119**

1. Effets d'une exposition gestationnelle répétée aux PFD sur le développement neurocomportemental de la descendance au stade fœtal	121
1.1. Les particules de fumées de moteur diesel semblent atteindre les structures olfactives fœtales.....	121
1.1.1. Des dépôts particuliers de taille nanométrique sont présentes dans les tissus olfactifs des animaux exposés	121
1.1.2. Plusieurs voies non exclusives de transport des particules vers les tissus olfactifs des animaux exposés	122
1.2. L'exposition aux PFD entraîne l'apparition d'altérations anatomo-histologiques au niveau des tissus olfactifs.....	123
1.3. L'exposition répétée aux PFD altère la neuromodulation bulbaire chez les fœtus exposés.....	125
1.3.1. La dénervation des projections centrifuges des systèmes neuromodulateurs pourrait être à l'origine des atteintes monoaminergiques décrites	125
1.3.2. L'altération de la sensibilité olfactive des lapereaux serait consécutive à cette dénervation monoaminergique	126
1.4. Les perturbations olfactives induites par les PFD peuvent être indicatives de perturbations au niveau de structures cérébrales plus centrales.....	127
1.4.1. L'exposition gestationnelle répétée aux PFD altère la modulation dopaminergique centrale chez les fœtus exposés	128
1.4.2. Les modifications de la neuromodulation dopaminergique pourraient être liées à des altérations sérotoninergique dans les mêmes structures	129
2. Effets à long terme d'une exposition gestationnelle répétée aux PFD sur le développement neurocomportemental de la descendance à l'âge adulte	132
2.1. Les animaux exposés in utero aux PFD pourraient avoir des difficultés à identifier les odeurs à l'âge adulte.....	132
2.2. Les effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la neuromodulation monoaminergique du système olfactif persistent à l'âge adulte.....	133

2.3. Les animaux ayant subi une exposition gestationnelle répétée aux PFD <i>in utero</i> présentent une persistance des dérégulations de la neuromodulation centrale.....	134
2.3.1. <i>L'exposition gestationnelle répétée aux PFD altère neuromodulation dopaminergique des adultes exposés</i>	134
2.3.2. <i>Si la voie sérotoninergique ne présente pas d'altérations majeures, la voie kynurénine se voit altérée chez les adultes exposés</i>	135
3. L'exposition gestationnelle aux PFD semble mener à des altérations sexe dépendantes des systèmes neuromodulateurs _____	136
4. Pertinence et limitations de l'étude _____	137
4.1. Le lapin reste un bon modèle de placentation humaine en toxicologie.....	137
4.2. Les effets neurodéveloppementaux observés ne semblent pas être dus aux conditions d'exposition.....	138
4.3. L'exposition « nose-only » reste un bon modèle des pour la représentation des conditions d'exposition des populations humaines urbaines.....	139
5. Conclusion générale et perspectives l'étude _____	141

Annexes et liste des communications

Bibliographie

Remerciements

Je remercie le Docteur Anna Bencsik et le Professeur Alain Trembleau d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et le Professeur Sylvie Granon d'avoir donné son accord pour examiner ce travail doctoral. Je remercie également le Docteur Hélène Desqueyroux d'avoir accepté de suivre mon travail doctoral et de faire partie des membres de mon jury.

Je tiens d'abord à remercier mes encadrants, qui ont su me faire partager et me transmettre leur passion pour la recherche.

Merci au Docteur Christine Baly ; merci pour ton soutien et tes remarques constructives et, surtout, pour ton soutien et ta patience tout au long de ma thèse, et lorsque j'écrivais ma première publication. J'ai été ravie et honorée de travailler sous ta tutelle. Merci aussi pour ta bonne humeur, pour toutes ces séances de rires, sourires et fou-rires, et pour toutes ces discussions autour « d'un café ».

- Merci au Docteur Henri Schroeder d'avoir codirigé ce travail. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé toute l'autonomie nécessaire à sa réalisation. Merci de m'avoir toujours suivie, de près comme de loin et d'avoir, très souvent, pris le temps de répondre à mes innombrables questions et inquiétudes. Merci pour toutes ces discussions dynamiques et fructueuses et pour tes nombreux conseils. Merci de m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement universitaire à plusieurs reprises, et de m'avoir souvent donné l'occasion de présenter mes résultats de thèse lors de différents congrès et colloques.

Je souhaite remercier le Professeur Jean Luc Olivier, directeur de l'équipe d'accueil Calbinotox (Composés alimentaires : Biofonctionnalités et risques neurotoxiques), et le Docteur Edith Pajot, directrice de l'unité NBO Neurobiologie de l'olfaction) de m'avoir accueilli dans leur équipe et de m'avoir permis de réaliser mon travail doctoral, et donner leur soutien tout au long de ma thèse, aussi bien moral que scientifique.

Merci à tous les membres de NBO avec qui j'ai adoré interagir et qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, à enrichir mon expérience au sein de cette équipe.

Je te remercie en particulier Denise ; merci pour ton dynamisme inégalable ; merci d'avoir su me transmettre ton savoir et ton savoir-faire dans la bonne humeur.

Je tiens à te remercier tout particulièrement Didier, pour ta présence, toujours dans la convivialité et la bonne humeur. Merci d'avoir été là pour me fournir des conseils pertinents, qu'ils soient professionnels ou personnels, le tout sans oublier de toujours faire preuve d'une extrême gentillesse.

Merci Marie Annick pour tes intuitions scientifiques et humaines toujours justes. Tu as été d'une aide inestimable, à la fois pour les manips et pour tes conseils techniques, mais également pour les matins un peu difficiles ; merci de m'avoir donné un coup de main (et même deux) quand j'en avais besoin.

Un grand merci, Marie Christine, pour ton aide intellectuelle et expérimentale, qui ont largement contribué à ces travaux de thèse. Merci de m'avoir transmis ton savoir-faire, ta bonne humeur et ton enthousiasme jamais fléchissant.

Je tiens à remercier Karine, Angélique, Aurélie, Gaëlle, Catherine, Nicolas, Bertrand, Adrien et Vincent, toujours là pour partager de bons moments.

Je souhaite particulièrement remercier le Docteur Christine Longin. Merci pour ton aide, et ton soutien. Merci de m'avoir permis de découvrir le monde de la microscopie électronique, et pour les échanges intéressants que nous avons eu à ce sujet (et sur bien d'autres sujets).

Je souhaite aussi particulièrement remercier le Professeur Jacques Callebert. Merci pour votre aide lors des dosages en HPLC mais aussi pour le temps et la patience que vous m'avez accordé pour m'expliquer votre univers et trouver un sens à toutes ces données neurochimiques.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe Calbinotox, pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide. Merci pour votre disponibilité et vos conseils.

Je souhaite aussi tout particulièrement remercier Pascaline et Benoit. Je pense que, cette thèse, vous l'avez vécue en même temps et tout autant que moi, jour après jour. Merci d'avoir toujours été là pour me remonter le moral et me redonner confiance.

Je tiens aussi à remercier Aline, Katy, Patricia, Yordenca Lola, Justine et Sonia, non pas individuellement, puisque je n'aurais pas la place de dire à quel point vous avez été importantes pour moi, et que cela n'aurait guère de sens ici. Mais merci d'avoir été là ; merci d'avoir été le grand rayon de soleil me permettant de continuer chaque journée.

Merci à tous ceux qui ont partagé mon quotidien au laboratoire et à l'équipe pédagogique. Vous croiser dans les couloirs a toujours été un plaisir.

Enfin, je tiens à remercier Xavier et Simon, véritables compagnons de guerre du quotidien, toujours là pour partager de bons moments, pour se détendre lors de discussions sans queue ni tête, échanger des opinions et théories farfelues, se soutenir en cas de coups durs et j'en passe.

Merci aussi à tous mes amis de maternelle, collège, lycée et fac. Vous m'avez permis de garder les pieds sur terre en me permettant de m'évader, de temps en temps, du milieu scientifique.

Enfin, je remercie toute ma famille pour sa présence, son soutien et son amour. Merci à vous de m'avoir toujours poussée au delà de mes limites et d'avoir eu confiance en moi.

Résumé

La pollution atmosphérique, et plus particulièrement celle liée à la phase particulaire, est une préoccupation majeure de santé publique, plusieurs études épidémiologiques la rendant responsable de la mort prématurée de dizaines de milliers d'individus par an. En dehors de son impact sur les systèmes respiratoires et cardiovasculaires, elle est également pointée du doigt dans l'accroissement des affections neurologiques chez l'adulte. Parmi ses composants, les particules fines et ultrafines émises par les moteurs diesel sont aujourd'hui très critiquées. En effet, ces particules sont capables de gagner le système circulatoire et d'atteindre divers organes, et dans une certaine mesure le cerveau. Si leur neurotoxicité est fortement suspectée dans les populations directement exposées, les conséquences d'une exposition maternelle sur la maturation cérébrale fœtale et sur le développement neurocomportemental de l'individu après la naissance restent mal connues. Plusieurs études récentes menées sur l'homme ou des modèles animaux soulignent pourtant des risques neurotoxiques liés à l'exposition gestationnelle, du fait de la fragilité particulière du cerveau en développement. Néanmoins, les conséquences d'une exposition maternelle sur le développement du cerveau du fœtus et sur la maturation cérébrale fœtale et sur le neurodéveloppement de l'individu après la naissance sont peu étudiées dans des conditions de faible exposition contrôlée et répétée. Cette thèse, financée par l'ADEME dans le cadre du projet ANSES BrainAirPoll (EST 2014/1/190) a étudié les effets neurotoxiques à court et long terme d'une exposition gestationnelle aux fumées de moteur diesel enrichies en particules fines dans des conditions mimant l'exposition humaine. Ce travail a été mené chez le lapin, un modèle animal de la placentation humaine. Il s'est focalisé sur la description des atteintes sur le continuum anatomique et fonctionnel entre système olfactif et cerveau par des approches comportementales, neurochimiques et histologiques chez le fœtus en fin de gestation et chez l'adulte.

Au stade fœtal, les résultats suggèrent la présence d'amas de particules de taille nanométrique sans que leur nature soit déterminée dans les tissus olfactifs des animaux exposés, une désorganisation cellulaire de ces tissus et des atteintes neurochimiques localisées au niveau du bulbe olfactif et dans certaines régions du cerveau pour la transmission dopaminergique et sérotoninergique, suggérant une dénervation des systèmes neuromodulateurs bulbaires centrifuges venant du système nerveux central. A la naissance, une modification de la sensibilité olfactive périnatale chez les lapereaux en réponse à la phéromone mammaire, dont la perception est essentielle au déclenchement du comportement de tétée, est associée, suggérant une modification des réseaux nerveux des individus issus de mères exposées. Les perturbations neurochimiques persistent à long terme, malgré peu d'impact sur les comportements à base olfactive. De façon intéressante, un effet différentiel de l'exposition aux gaz d'échappement de moteur diesel filtré selon le sexe est observé sur les systèmes monoaminergiques des fœtus et adultes.

Les atteintes neurodéveloppementales touchant le continuum anatomo-fonctionnel entre le système olfactif et le cerveau décrites ici indiquent un potentiel neurotoxique à confirmer et soulignent la nécessité d'investiguer de façon plus approfondie l'éventuel lien avec l'émergence des maladies humaines neurodégénératives. Ces données confirment que la phase prénatale doit être considérée comme une fenêtre importante pour le développement du cerveau, au cours de laquelle il existe une susceptibilité élevée aux agressions de l'environnement. Les autorités publiques devraient donc envisager de donner priorité à la prévention de l'exposition de la femme enceinte à un environnement pollué.

Abstract

Airborne pollution, especially from diesel exhaust, is a major public health concern. Several epidemiological studies make it responsible for the premature death of tens of thousands of individuals per year. Apart from its impact on the respiratory and cardiovascular systems, it is also pointed at increasing neurological diseases in adults. Among its components, the fine and ultrafine particles emitted by diesel engines are highly criticized. Indeed, these particles are able to gain the circulatory system to reach various organs and, in a certain degree, the brain. If their neurotoxicity is highly suspected in directly exposed populations, the consequences of maternal exposure on both fetal brain maturation and neurobehavioral development after birth remain poorly understood. Several recent studies conducted on humans or animal models have highlighted neurotoxic risks related to gestational exposure, due to the fragility of the brain at such critical period for its anatomic and functional development. Nevertheless, the consequences of maternal exposure on fetal brain maturation and neurobehavioral development after birth remain poorly understood in conditions of controlled and repeated low exposure. The aim of the thesis, funded by ADEME as part of the ANSES BrainAirPoll project (EST 2014/1/190), was to study the short- and long-term neurotoxic effects of gestational exposure to diesel engine fumes enriched with fine particles in conditions mimicking human exposure. The work was conducted in rabbit, because of its hemodichorial placentation which is anatomically and functionally closer to that in humans than that in rodents. It focused on describing the damages to the anatomical and functional continuum between the olfactory system and the brain using behavioral, neurochemical and histological approaches in the late fetus and in adults.

The results suggest the presence of chemically undefined nanosized particles in fetal olfactory tissues of exposed animals and a cellular disorganization of the same tissues, which is associated to localized neurochemical damage in the olfactory bulb and in several regions of the brain involved in dopaminergic and serotonergic transmission, suggesting a denervation of centrifugal bulbar neuromodulatory systems from the central nervous system. At birth, a modulation in perinatal olfactory sensitivity in rabbits in response to the mammary pheromone, the perception of which is essential for triggering feeding behavior, is observed, suggesting a modification of the nervous networks of individuals born to exposed dams. Neurochemical disturbances persist in adults, despite little impact on olfactory-based behaviors. Interestingly, a sex-dependent differential effect of exposure to filtered diesel engine exhaust on monoaminergic systems is observed in fetuses and adults. We propose that these neurodevelopmental perturbations of the anatomo-functional continuum between the olfactory system and the brain may indicate a neurotoxic potential to be confirmed and underline the need to further investigate the eventual link with the emergence of human neurodegenerative diseases. These data confirmed that prenatal phase should be considered as an important window for brain development, during which there is an elevated susceptibility to environmental insults. Preventing exposure of pregnant woman to a polluted environment should, therefore, be considered by public authorities.

Liste des abréviations

2MB2	2-Methyl-3-butyn-2-ol
5-HIAA	5-hydroxyindolacétique
5-HT	Sérotonine
Ac	Commissure antérieure
Acb	Noyau Accumbens
AcbC	Noyau Accumbens core
AcbS	Noyau Accumbens shell
AChE	Acétylcholinestérase
AD	Maladie d'Alzheimer
ADEME	Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
Amy	Amygdale
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AON	Noyau olfactif antérieur
BDNF	facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BO	Bulbe olfactif
BC	Black carbon
BSA	Albumine sérique bovine
CAH	Composés aromatiques hétérocycliques
Cd	Caudé
Cg	Cingulum
Cli	Noyau du Raphé caudal linéaire
CN	Cavité nasale
CO	Cytochrome oxydase
COV	Composés organiques volatiles
CPF	Cortex préfrontal
CVT	Cervelet
CxT	Cortex temporal et entorhinal
DA	Dopamine
DAB	Diaminobenzidine
DE	Diesel exhaust
DEP	Diesel exhaust particle
dk	bouton dendritique
DOPAC	Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique
DRD	Raphé dorsal
DRV	Raphé ventral
E	Jour embryonnaire
eNOS	Oxyde nitrique synthase –forme endothéliale
ENT	Cortex entorhinal
EO	Epithélium olfactif
EOC	Cellules olfactives engainantes

EPAPP	Effets de la Pollution Atmosphérique sur la fonction Placentaire et le développement Post-natal
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GD	Gestational day
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GI	Glomérules
GLM	Modèle linéaire général
Gr	Granulaire
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HBCDD	HexaBromoCycloDoDecane
HdB	Bande diagonale horizontale de Broca
Ho	Hypothalamus
Hp	Hippocampe
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
HVA	Acide homovanillique
iNOS	Oxyde nitrique synthase –forme inductible
IV	Intraveineuse
K	Kynurénine
LC	Locus coeruleus
LSI	Septum latéral intermédiaire
MAPCEL	Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory
MC3R	Récepteur de la mélanocortine-3
Mes	Mésencéphale
MET	Microscopie électronique à transmission
MHPG	3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol
mi	mitochondrie
MnR	Raphé médian
MO	Muqueuse olfactive
N.Rh	Noyaux du Raphé
NA	Noradrénaline
nc	Cavité nasale
NSO	Neurone sensoriel olfactif : changer dans le texte OSN pour NSO
NOx	Oxydes d'azote
nu	Noyau
oc	Cils olfactifs
OE	Epithélium olfactif
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD	Maladie de Parkinson
PFA	Paraformaldehyde
PFD	Particules fines de diesel
PG	Cellule Périglomérulaire
Pir	cortex piriforme

PM	Matière particulaire
PMnR	Noyau paramédian
PND	Post-natal day
Ptg	Noyau tegmental pédonculopontin
Put	Putamen
QI	Quotient Intellectuel
Rbd	Noyau rhabdoïde
RT-qPCR	Reverse-transcription- quantitative Polymerase chain reaction
ROI	Région d'intérêt
RO	Récepteur olfactif
SN	Substance noire
SNc	Substance noire <i>pars compacta</i>
SNr	Substance noire <i>pars reticulata</i>
SNC	Système nerveux central
SO₂	Dioxyde de soufre
SSC	Saline sodium citrate
Str	Striatum
SVZ	Zone sous-ventriculaire
Tc	Tronc cérébral
Th	Thalamus
TH	Tyrosine hydroxylase
TiO₂	Dioxyde de titane
To	Tractus olfactif
Tu	Tubercule olfactif
TRP	Tryptophane
TrpH	Tryptophane hydroxylase
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UFPM	Ultrafine particulate matter
VTA	Aire tegmentale ventrale
ZNO	Zone non odorisée
ZO	Zone odorisée

Liste des illustrations

Section introductive

Encadré 1 : Genèse d'une particule de diesel

Encadré 2 : Anatomie du Système Nerveux Central (SNC)

Encadré 3 : Le cerveau en développement est particulièrement sensible

Encadré 4a : Complexité de la matière particulaire

Encadré 4b : Marqueurs de l'exposition à la pollution atmosphérique utilisés dans les études épidémiologiques

Encadré 5 : Le lapin, un modèle de reproduction pour la santé humaine

Encadré 6 : La Muqueuse Olfactive (MO)

Encadré 7 : Le Bulbe Olfactif (BO)

Figure A1 : Représentation graphique des deux grandes familles de polluants atmosphériques

Figure A2 : Représentation graphique de la taille relative des particules fines et mise en évidence la de la facilité des particules à pénétrer le tractus pulmonaire

Figure A3 : Représentation graphique des concentrations en PM₁₀ et PM_{2.5} dans l'Union européenne (28 pays) de 2004 à 2014, en microgrammes (en µg/m³)

Figure A4 : Composition chimique d'une particule de diesel

Figure A5 : Place des voitures diesel dans le marché européen.

Figure A6 : Représentation graphique et comparaison des différents types d'émissions rejetées par les voitures essence et diesel (d'après l'Euro 6)

Figure A7 : Récapitulatif des valeurs limites, des seuils et des objectifs de qualité pour différents polluants atmosphériques en Europe

Figure A8 : Image représentant deux voies d'entrée possibles des particules au cerveau, et les possibles atteintes neuronales associées

Figure A9 : Atteintes neurologiques suspectées d'être associées à l'exposition directe aux particules

Figure A10 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD chez l'animal.

Figure A11 : Translocation de nanoparticules (NP) vers le système nerveux

Figure A12 : Translocation de nanoparticules (NP) inhalées dans la circulation sanguine

Figure A13 : Translocation de nanoparticules (NP) vers le système nerveux via la voie olfactive

Figure A14 : Aperçu des principaux effets de la présence des particules dans la circulation sanguine sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

Figure A15 : Connectivité entre l'épithélium et le bulbe olfactif

Figure A16 : Synaptologie bulbaire.

Figure A17 : Projections centripètes du bulbe olfactif.

Figure A18 : Connectivité entre le bulbe olfactif et diverses aires cérébrales

Figure A19 : Représentation schématique des projections centrifuges vers le bulbe olfactif

Figure A20 : Projection des systèmes neuromodulateurs vers le bulbe olfactif

Figure A21 : Les polluants inhalés par la mère peuvent atteindre le SNC fœtal et altérer la mise en place et le maintien des circuits neuronaux.

Tableau A1 : Synthèse des résultats issus des données épidémiologiques

Tableau A2 : Classification et description des différents types de placentation

Section méthodologique

Figure B1 : Distribution de la taille des particules lors de l'exposition

Figure B2 : Représentation graphique des différents intervenants

Figure B3 : Procédure expérimentale et collecte des tissus d'intérêt

Figure B4 : Schéma du dispositif utilisé pour le test de la boule à thé

Figure B5 : Réalisation des coupes ultrafines

Figure B6 : Illustrations sur des figures issues de l'atlas de rat des différentes localisations de punches réalisés au cryostat

Figure B7 : Représentation du plan de coupe des cerveaux de lapins adultes

Figure B8 : Analyse du niveau de TH⁺ au niveau de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale des fœtus F1

Figure B9 : Analyse du niveau de TrpH⁺ au sein des noyaux du Raphé des fœtus F1.

Figure B10 : Analyse des bulbes olfactifs marqués au TUNEL.

Figure B11 : Photographies de coupes de cerveau de lapin adulte F1 au niveau du striatum.

Tableau B1 : Composition flux de gaz d'échappement de moteur diesel.

Section expérimentale

Encadré 8 : Etude des conséquences à court terme d'une exposition gestationnelle aux PFD

Encadré 9 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur le système olfactif des animaux de la génération F1 au stade fœtal

Encadré 10 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur les systèmes neuromodulateurs des fœtus de la génération F1

Encadré 11 : Etude des conséquences à long terme d'une exposition gestationnelle aux PFD

Encadré 12 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur le système olfactif des animaux de la génération F1 au stade adulte

Encadré 13 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur les systèmes neuromodulateurs des adultes de la génération F1

Encadré 14 : Synthèse des résultats obtenus chez les adultes ayant subi une exposition gestationnelle aux PFD

Figure C1 : Poids du bulbe olfactif des fœtus de la génération F1 prélevés à GD28.

Figure C2 : Micrographie électronique des boutons dendritiques d'un neurone sensoriel olfactif (OSN) et des faisceaux d'axones olfactifs de fœtus F1 issus de mères contrôles (a-c) et exposées (b-d).

Figure C3 : Micrographie électronique de la couche glomérulaire des BO des fœtus F1 issus de mères contrôles (a) et exposées (b). Micrographie électronique de la couche granulaire (Gr) des BO des fœtus issus de mères contrôles (c) et exposées (d).

Figure C4 : Micrographie électronique de la partie apicale de l'épithélium olfactif des fœtus F1 issus de mères exposées.

Figure C5 : Micrographie électronique de la couche glomérulaire des bulbes olfactifs des fœtus F1 issus de mères exposées.

Figure C6 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie dopaminergique bulbaire chez des fœtus F1.

Figure C7 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les cellules dopaminergiques bulbaires chez des fœtus F1.

Figure C8 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les arrivées axonales dopaminergiques et cholinergiques au niveau du BO des fœtus.

Figure C9 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie sérotoninergique bulbaire des fœtus F1.

Figure C10 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie noradrénergique bulbaire chez des fœtus F1.

Figure C11 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le niveau apoptotique bulbaire chez des fœtus.

Figure C12 : Pourcentage de réponses positives des lapins à PND2 suite à la présentation de la phéromone mammaire de lapin 2MB2.

Figure C13 : Mesures morphométriques du cerveau et du corps des fœtus de la génération F1 prélevés à GD28.

Figure C14 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système dopaminergique central des fœtus F1.

Figure C15 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les rapports dopaminergiques centraux chez des fœtus F1.

Figure C16 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système sérotoninergique central des fœtus F1.

Figure C17 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le niveau de NA central chez des fœtus F1.

Figure C18 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND118.

Figure C19 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND118 après 16 heures de jeûne.

Figure C20 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND190.

Figure C21 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND190 après 16 heures de jeûne.

Figure C22 : Poids du bulbe olfactif des animaux adultes de la génération F1 prélevés à PND216.

Figure C23 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie dopaminergique bulbaire des adultes F1.

Figure C24 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les arrivées axonales dopaminergiques et cholinergiques au niveau du BO des adultes F1.

Figure C25 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie kynurénine bulbaire chez des adultes F1.

Figure C26 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie sérotoninergique bulbaire des adultes F1.

Figure C27 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie noradrénergique bulbaire des adultes F1.

Figure C28 : Mesures morphométriques du cerveau et du corps des adultes F1 prélevés à PND216.

Figure C29 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le niveau de DA central chez les adultes F1.

Figure C30 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les niveaux de DOPAC et HVA centraux chez les adultes F1.

Figure C31 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les rapports dopaminergiques centraux chez les adultes F1.

Figure C32 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie kynurénine centrale chez des adultes F1.

Figure C33 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur système sérotoninergique central chez des adultes F1.

Figure C34 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur système noradrénergique central chez des adultes F1.

Tableau C1 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système dopaminergique des fœtus F1.

Tableau C2 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE des fœtus F1.

Tableau C3 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système sérotoninergique des fœtus F1.

Tableau C4 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE au niveau du tronc cérébral des fœtus F1.

Tableau C5 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système dopaminergique des adultes F1.

Tableau C6a : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE des adultes F1.

Tableau C6b : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE des adultes F1.

Tableau C7 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité CO des adultes F1.

Section conclusive

Figure D1 : Représentation schématique de l'hypothèse d'une réponse plastique compensatoire dopaminergique suite à une dénervation des autres systèmes neuromodulateurs bulbaires.

Figure D2 : Représentation schématique globale des altérations dopaminergiques observées chez les fœtus F1.

Figure D3 : Représentation schématique globale des altérations sérotoninergiques observées chez les fœtus F1.

Figure D4 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité CO au niveau de la substance noire (SN) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) chez des fœtus F1.

Figure D5 : Représentation schématique globale des altérations dopaminergiques observées chez les adultes F1.

Figure D6 : Représentation schématique globale des altérations sérotoninergiques observées chez les adultes F1.

Figure D7 : Représentation schématique globale des altérations sérotoninergiques observées chez les adultes F1.

SECTION INTRODUCTIVE

Partie I – La matière particulaire s'avère être un des polluants majeurs de l'air avec un impact sanitaire significatif

<u>1</u>	La pollution atmosphérique est un mélange complexe de matières particulaires, de gaz et de composés organiques	3
<u>2</u>	Les moteurs diesel sont sources d'une pollution particulaire questionnée pour sa toxicité	7
<u>3</u>	La pollution atmosphérique est un enjeu de santé publique	10

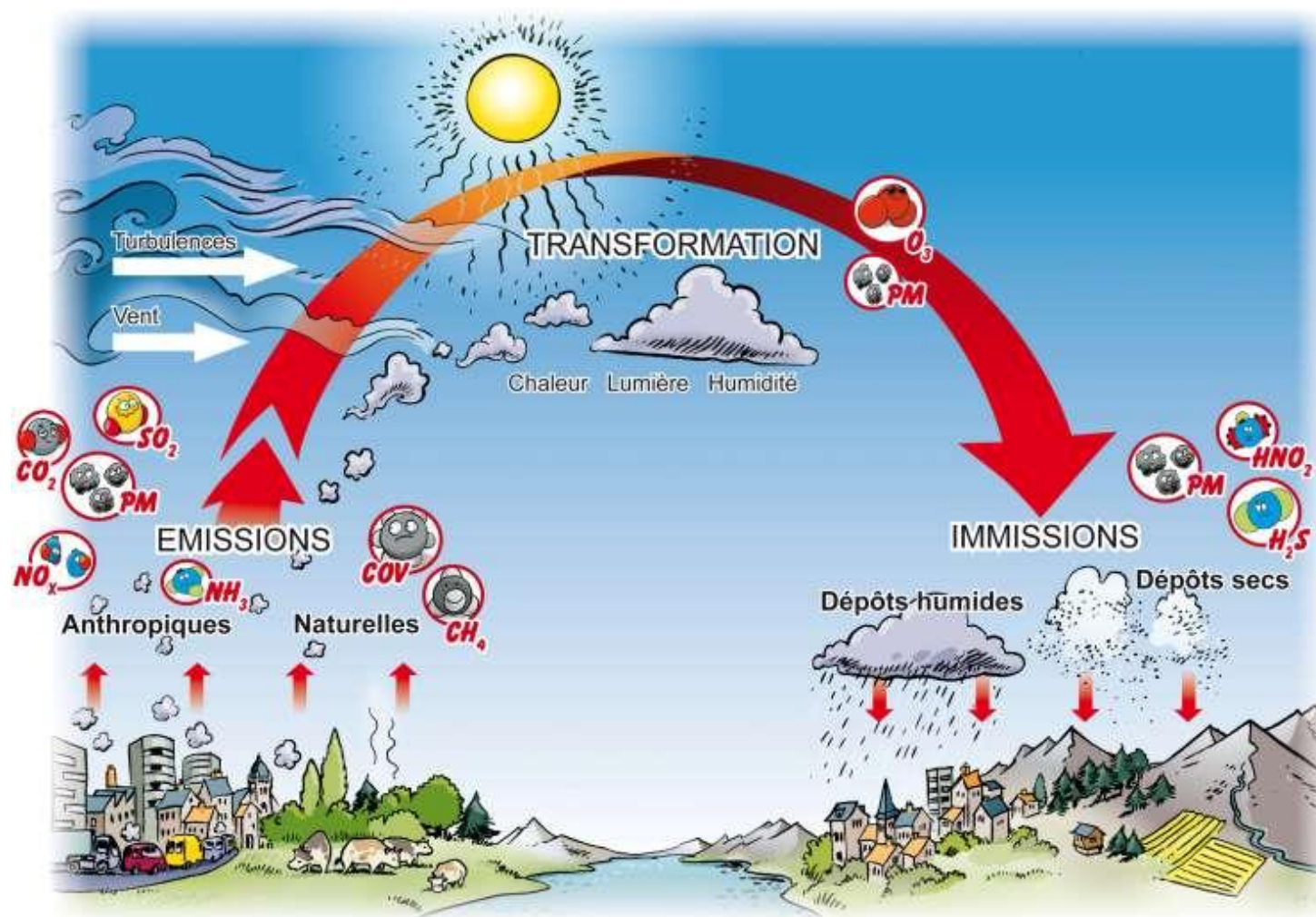


Figure A1 : Représentation graphique des deux grandes familles de polluants atmosphériques. Les polluants primaires (NO_x, SO_x, CO, COV) peuvent être d'origine atmosphérique ou provenir de sources naturelles comme l'érosion ou le volcanisme. Les polluants secondaires (particules secondaires, O₃, NO₂) ne sont pas directement rejetés dans l'atmosphère mais proviennent de réactions chimiques de gaz entre eux. Certains polluants sont à la fois des polluants primaires et secondaires, comme le NO₂ ou les particules. Image issue de <http://transalpair.eu/>.

1. La pollution atmosphérique est un mélange complexe de matières particulaires, de gaz et de composés organiques

1.1. Composition de la pollution atmosphérique

La pollution atmosphérique est constituée de deux grandes familles distinctes de polluants : les polluants primaires et les polluants secondaires.

Les **polluants primaires** sont les composés directement émis par les sources, qui contaminent ainsi majoritairement les lieux situés à proximité des activités émettrices. Ils incluent entre autres le dioxyde de soufre (SO_2), les oxydes de carbone (regroupant CO et CO_2), les oxydes d'azote (NO_x , regroupant NO et NO_2), les composés organiques volatiles (COV), les métaux et les particules primaires. Ces composés sont libérés dans l'atmosphère par des sources telles que les cheminées des usines ou les systèmes d'échappement des véhicules.

Les **polluants secondaires**, quant à eux, proviennent de la réaction chimique entre certains polluants primaires et des constituants de l'atmosphère, comme l'oxygène et l'eau. Des modifications physico-chimiques sous l'effet des conditions météorologiques (vent, gradients de température) contribuent à la formation de ces nouveaux polluants et à leur diffusion sur de longues distances.

Parmi ces substances, on trouve des agents chimiques, physiques ou microbiologiques de diverses origines et aux durées de vie variables dans l'environnement, qui peuvent générer des situations polluantes très hétérogènes. Les principaux polluants secondaires sont l'ozone, les autres NO_x (principalement NO_3^-) et les particules secondaires. A cause de leur mode de formation, ces polluants ne peuvent pas être utilisés pour dresser des inventaires d'émissions. La pollution atmosphérique représente donc un mélange complexe de ces polluants primaires et secondaires et comprend une fraction gazeuse, principalement issue de l'utilisation de combustibles fossiles (gaz, pétrole et charbon de bois), une fraction liquide et une fraction particulaire en suspension, constituée d'agglomérats complexes de particules solides présentes dans l'atmosphère.

L'origine des émissions peut être naturelle (éruptions volcaniques, décomposition de matières organiques, incendie de forêts...) ou anthropique (industrie, transport, agriculture ou chauffage résidentiel, par exemple). Par ailleurs, l'effet de serre, les pluies acides, la dégradation de la couche d'ozone et les effets climatiques, qui favorisent la propagation des composés, sont également considérés comme des phénomènes participant à la pollution atmosphérique (Figure A1).

L'ensemble de ces éléments font que la pollution de l'air constitue une problématique complexe difficile à évaluer et à traiter, et doit être prise en compte à plusieurs échelles. 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).

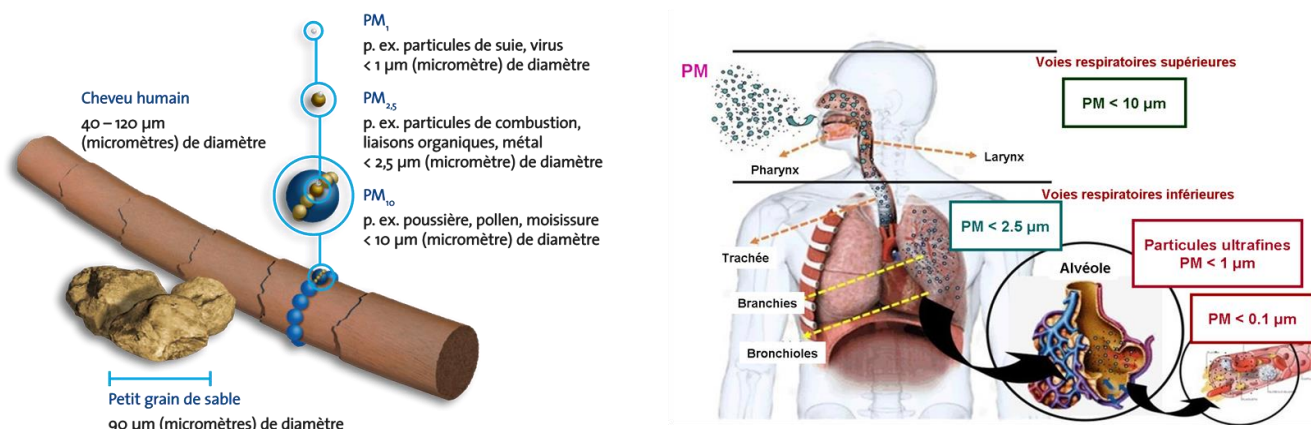


Figure A2 : Représentation graphique de la taille relative des particules fines et mise en évidence la de la facilité des particules à pénétrer le tractus pulmonaire Gauche. Comparaison des diamètres relatifs des particules fines par rapport à un cheveu ou un grain de sable. Images issues de www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics. Droite. Schéma mettant en évidence la capacité de pénétration des particules selon leur taille à différents niveaux du tractus pulmonaire via la circulation sanguine. Image modifiée à partir de <https://www.intechopen.com>.

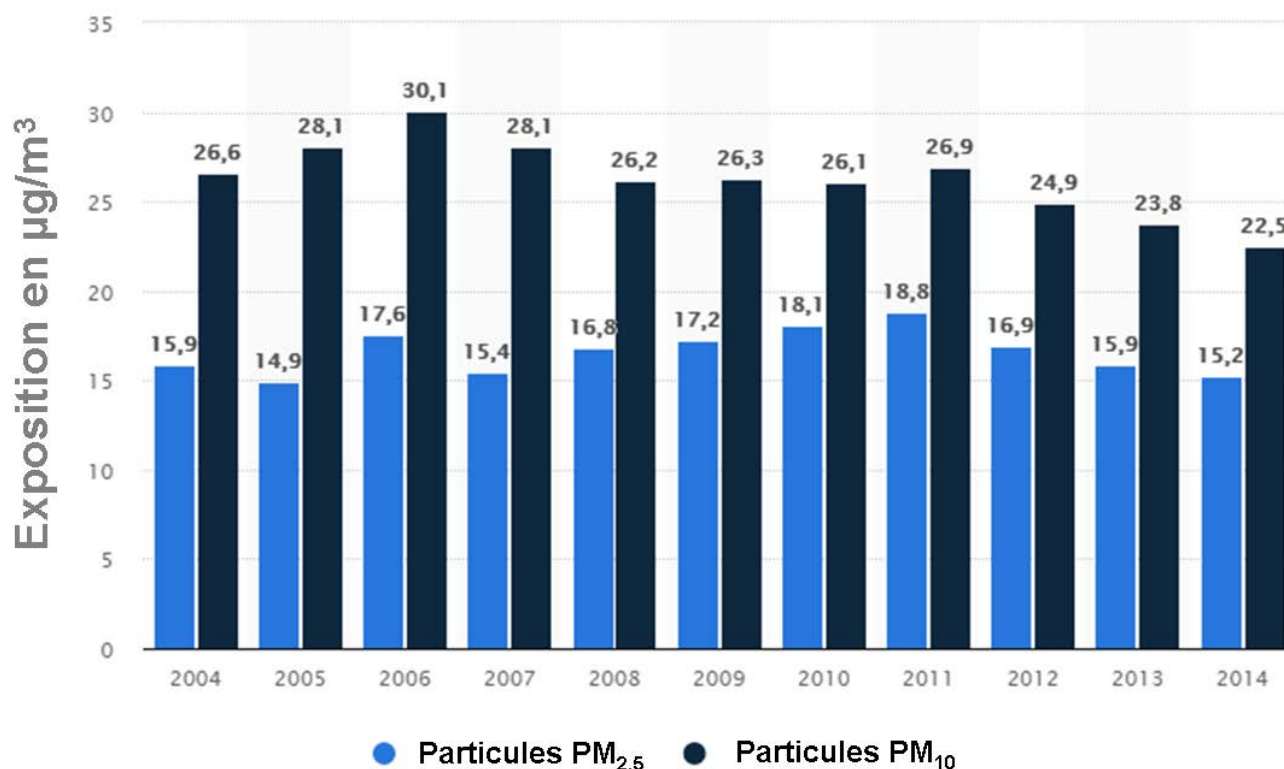


Figure A3 : Représentation graphique des concentrations en PM_{10} et $\text{PM}_{2,5}$ dans l'Union européenne (28 pays) de 2004 à 2014, en microgrammes (en $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Il en ressort qu'en 2013 la population urbaine dans l'UE était exposée à près de 24 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} et à 16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2,5}$. Données 2017. Image issue de <https://fr.statista.com/statistiques/580540/exposition-population-urbaine-pollution-particules-fines-suspension-pm10-pm25-ue/>.

1.1.1. La fraction particulaire ou PM (Particulate Matter)

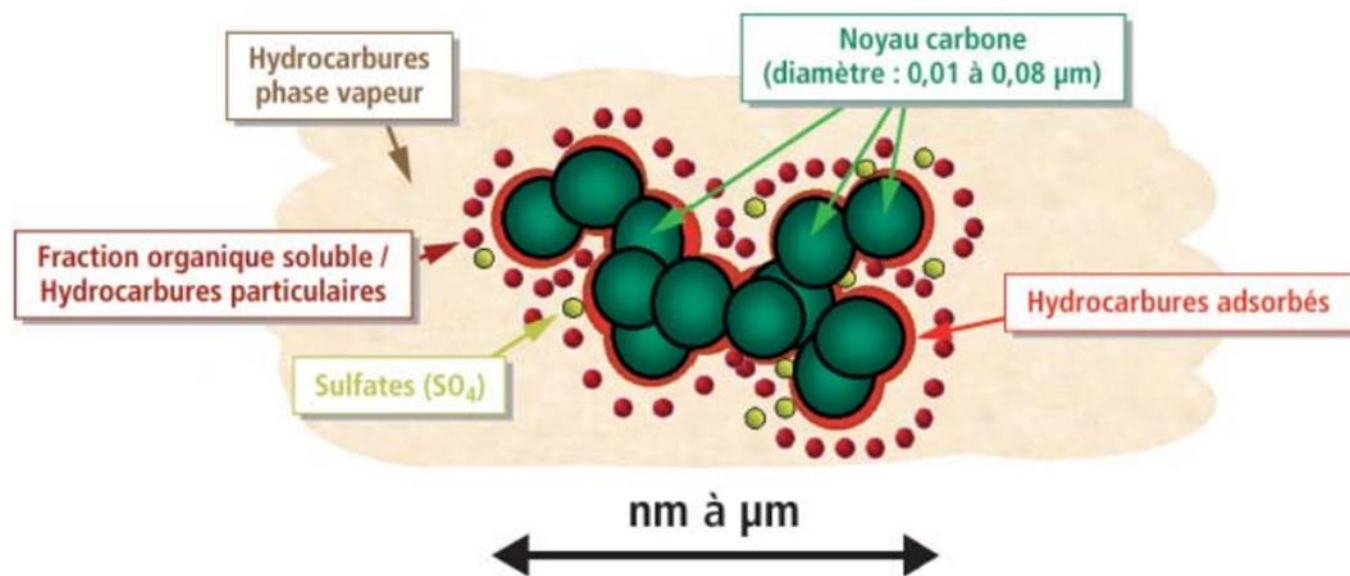
Les particules présentes dans l'air pollué sont généralement classées selon leur taille allant d'un très faible diamètre inférieur à 1 μm ou PM_{10} (c'est dans cette classe que l'on place la phase particulaire ultrafine ou UFPM, dite aussi nanoparticulaire car de diamètre $<100\text{ nm}$), jusqu'à de très grosses particules pouvant atteindre 20 μm en passant par des particules de taille intermédiaire ayant un diamètre compris entre 1 et 10 μm incluant les PM_{10} et les $\text{PM}_{2.5}$ (Figure A.2). Leur composition chimique dépend du type de source d'émissions sachant que plus elles sont petites, plus leur capacité à se disperser dans l'air et plus leur risque de pénétration dans l'organisme seront importants.

La catégorie des PM_{10} est la plus fréquemment utilisée comme indicateur de la concentration particulaire atmosphérique. Les concentrations annuelles moyennes varient entre 35 et 220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en Asie (Sivertsen, 2004, WHO, 2016) et entre 30 et 129 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en Amérique latine (Bourotte et al., 2005), alors que les variations sont comprises entre 15 et 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en Europe et en Amérique du Nord (CAFE, 2004 ; Sivertsen & El Seoud, 2004 ; USEPA, 2003 ; WHO, 2016).

Les particules de la catégorie $\text{PM}_{2.5}$ sont, quant à elles, de bons indicateurs des risques de la pollution atmosphérique sur la santé respiratoire (WHO, 2006). En effet, en raison de leur faible diamètre, ces particules peuvent pénétrer profondément dans les poumons et atteindre la circulation sanguine (Wichmann, 2007). Les concentrations annuelles moyennes varient entre 55 et 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en Asie et dans les Emirats (WHO, 2016, 2018), alors qu'elles sont de l'ordre de 9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en Amérique du Nord et de 16 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en Amérique latine (USEPA, 2015 ; WHO, 2016, 2018). En Europe, la concentration annuelle en $\text{PM}_{2.5}$ est comprise entre 10 à 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ à côté d'axes de trafic routier et 7 à 13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en zone rurale (CAFE, 2004 ; WHO, 2016, 2018) (Figure A.3).

Les particules de type UFPM sont issues de la nucléation, phase initiale du processus de transformation d'un gaz en particule. Leur diamètre peut croître par un phénomène de condensation (lorsque des composés gazeux se condensent à la surface de la particule) ou de coagulation (lorsque deux ou plusieurs particules s'agrègent pour en former une plus grosse).

Il est à noter que, pour un même volume, ces particules adsorbent une plus grande quantité de composés organiques et métalliques à leur surface que les plus grosses particules, raison pour laquelle elles sont suspectées de provoquer des effets plus graves sur la santé par rapport aux PM_{10} et $\text{PM}_{2.5}$ (Ibald-Mulli et al, 2002 ; Nel, 2005). Cependant, cette catégorie de particules n'a pas encore été utilisée comme indicateur de risques pour la santé ni soumise à réglementation 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).



Structure élémentaire d'une particule de combustion automobile.

Figure A4 : Composition chimique d'une particule de diesel. Les particules Diesel se composent d'un matériau carboné (la suie : noyau de carbone ou « sphérule »), engendré lors de la combustion, sur lequel sont adsorbées des espèces organiques diverses, constituées de molécules condensées lors des étapes suivant la combustion. Image issue de [ADEME, 2005](#).

1.1.2. La fraction gazeuse

Cette fraction comprend de nombreux composés chimiques dont les plus importants quantitativement et les plus préoccupants pour la santé sont l'ozone (O_3), le monoxyde de carbone (CO), les oxydes d'azote (NO_x), le dioxyde de soufre (SO_2) et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

L'ozone (O_3) est un des problèmes de pollution atmosphérique le plus répandu au niveau mondial, d'autant plus que ce gaz qui est produit photochimiquement, peut être transporté sur des milliers de kilomètres. Sa concentration peut atteindre des pics de $400 \mu g/m^3$ dans certaines villes américaines ([USEPA, 2003](#)). En région parisienne, sa concentration annuelle reste stable depuis 2005 de l'ordre de $240 \mu g/m^3$ ([AirParif, 2016](#)).

Le CO est présent dans les atmosphères urbaines en raison des émissions directes et de la production photochimique. Les niveaux sont généralement de l'ordre de 1 à $10 \mu g/m^3$ mais peuvent être plus élevés en cas de stagnation des nuages de pollution. Les niveaux de carbone élémentaire (black carbon, BC) sont souvent fortement corrélés avec les taux de CO, car ils proviennent souvent des mêmes sources ([HEI, 2013](#)).

Les NO_x ont comme source principale le trafic routier et le chauffage urbain. Ils sont émis naturellement par la combustion et sont présents dans l'environnement à des niveaux entre $0,02$ et $10 \mu g/m^3$. Les concentrations urbaines peuvent atteindre plus de $1000 \mu g/m^3$, mais sont généralement de l'ordre de 10 à $100 \mu g/m^3$ ([Seinfeld & Pandis, 2006](#)). Si on ne considère que le NO_2 , la concentration moyenne annuelle aux États-Unis est de $36 \mu g/m^3$, avec 10% des villes ayant une concentration annuelle de plus de $55 \mu g/m^3$ ([USEPA, 2003](#)). En Europe, la concentration moyenne en NO_2 dans l'air varie de $14 \mu g/m^3$ à $44 \mu g/m^3$ ([Eerens et al., 2005](#)). En région parisienne, sa concentration annuelle reste stable depuis 2007 et est aux environs de $380 \mu g/m^3$ ([AirParif, 2016](#)).

Le dioxyde de soufre (SO_2) provient de la combustion des énergies fossiles. Entre 2000 et 2005, la concentration moyenne annuelle en SO_2 dans l'air des villes d'Asie, d'Europe, d'Afrique et d'Amérique du Nord et du Sud, avoisinait $20 \mu g/m^3$, et excédait $50 \mu g/m^3$ pour certaines d'entre elles ([WHO, 2006](#)). En région parisienne, sa concentration annuelle reste stable depuis 2010 de l'ordre de $100 \mu g/m^3$ ([AirParif, 2016](#)).

1.2. Sources de la pollution atmosphérique

1.2.1. Le trafic routier

Une des principales sources de pollution atmosphérique est le trafic routier, toutes émissions confondues et sans distinction de taille des véhicules, ce qui pose de graves problèmes de santé publique dans les grandes villes ([CITEPA, 2015](#)). Deux tiers des émissions d'oxydes d'azote, ainsi que la moitié de celles de PM_{10} et de $PM_{2.5}$ sont issus des gaz d'échappement de moteur diesel (DE pour Diesel Exhaust) qui sont les principaux émetteurs de ces catégories de polluants primaires ([Ghio et al., 2012](#)).

Encadré 1 : Genèse d'une particule de diesel

Les entités précurseur des particules de diesel sont des plaquettes carbonées constituées d'hydrocarbures aromatiques polycycliques qui, par accumulation et réarrangement, forment des microstructures sphériques de carbone de quelques nanomètres (10^{-9} m) : les sphérules.

Celles-ci peuvent donner naissance à des structures plus grosses (20 à 40 nm) en s'agglomérant entre elles. Cette structure élémentaire connaît une croissance par collisions et agglomérations jusqu'à environ 20 à 40 nm. Au-delà, il y a association, sous forme d'agrégats et de chaînes, plus ou moins ramifiées. Cette structure peut encore grossir encore en intégrant par adsorption des composés présents dans la phase gazeuse (HAP, composés soufrés...).



Micrographie électronique d'agglomérats et sphérules de carbone des particules diesel automobiles. Structure en agglomérat des particules issues d'un Moteur Diesel MDR 06 2045 (RVI). Source ESIM pour ADEME ([ADEME, 2005](#))

Le DE contient plus de 40 polluants atmosphériques toxiques, dont une part importante de particules, incluant des particules de type UFPM (Figure A4 et Encadré 1). 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, elles ont des propriétés de surface plus réactive, ce qui leur permet de se lier facilement à d'autres toxines dans l'environnement. Ces particules issues des moteurs diesel ou DEP (pour Diesel Exhaust Particles) s'avèrent donc être un polluant majeur de l'air ([Costa et al, 2014](#) ; [Donaldson et al, 2005](#)).

1.2.2. L'énergie fossile et les activités industrielles

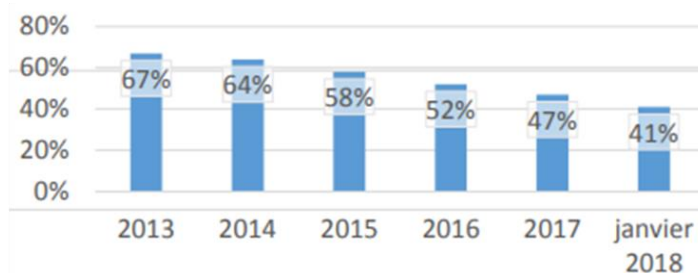
La combustion d'énergies fossiles dans les centrales productrices d'énergie est la deuxième source d'émissions polluantes dans la plupart des pays industrialisés ([Petitjean, 2016](#)). La combustion à haute température produit des NO_x et du SO₂, ainsi que des composés organiques volatiles provenant surtout de la combustion partielle du charbon et du pétrole.

La troisième source d'émissions comprend les industries utilisant des procédés conduisant à des émissions de polluants atmosphériques comme les NO_x, le SO₂ et les composés volatiles organiques.

Il est à noter que les feux de forêts et la combustion de la biomasse représentent une source non négligeable d'émission de ces polluants avec des émissions par combustion incluant les NO_x, le CO, les composés organiques volatiles et les particules en suspension. Cependant, ces sources restent difficilement quantifiables du fait du caractère imprévisible de ces événements.

Enfin, l'élevage produit environ 9% des émissions anthropiques de CO₂ dues à l'expansion des pâturages mais aussi à l'utilisation d'énergie fossile pour le fonctionnement des engins agricoles ou encore le chauffage des bâtiments ([Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006](#)).

A



B

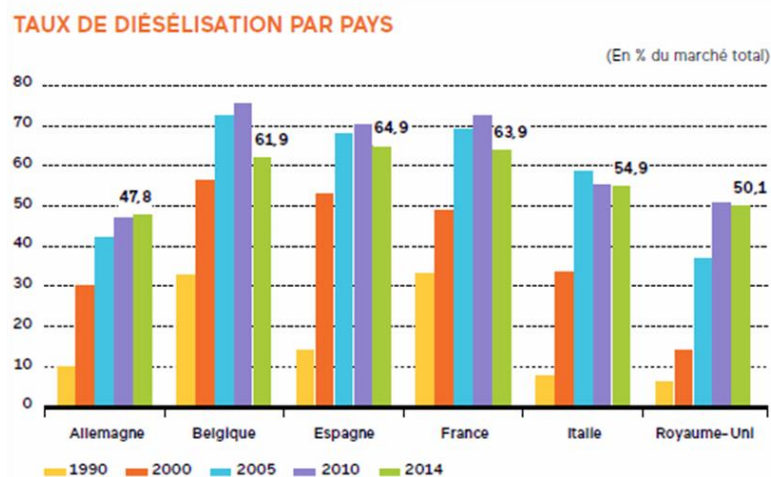


Figure A5 : Place des voitures diesel dans le marché européen. **A.** Evolution du marché français des voitures diesel. Représentation graphique de l'évolution des immatriculations des voitures diesel entre 2013 et 2018 (en pourcentage). **B.** Taux de « diésélisation » par pays. Représentation graphique, par rapport au marché total, de voitures diesel dans 6 pays d'Europe occidentale entre 1990 et 2014. Images prises sur www.fiche-auto.fr. Consulté le 13 Avril 2019.

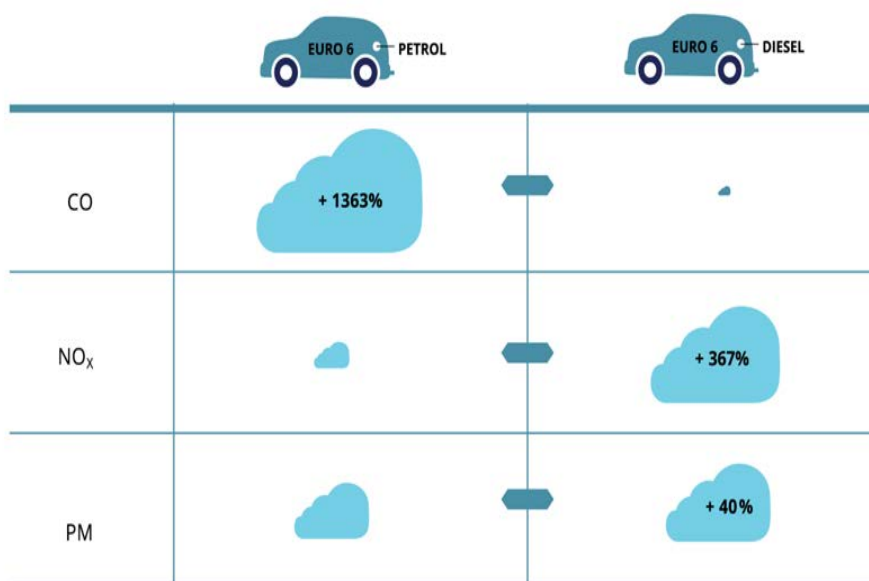


Figure A6 : Représentation graphique et comparaison des différents types d'émissions rejetées par les voitures essence et diesel (d'après l'Euro 6). Image adaptée de l'EEA (2016a).

2. Les moteurs diesel sont sources d'une pollution particulaire questionnée pour sa toxicité

Alors que le parc automobile des véhicules à essence baissait petit à petit, celui du diesel a littéralement explosé entre 1995 et 2005 pour ralentir sa progression ensuite (Figure A5). Bien que le gazole régresse, il reste le carburant préféré des français : les voitures diesel représentent ainsi 64 % des 32 millions et demi de véhicules en circulation en France en 2017 ([ADEME, 2018](#)).

Breveté en 1892 par Rudolf Diesel, le moteur diesel offre en effet plus d'efficacité énergétique que les moteurs à essence et est plus robuste, ce qui explique ses avantages économiques et son développement fulgurant. De plus, la motorisation diesel dégage moins de CO₂ qu'un moteur à essence. Cependant, les moteurs diesel émettent plus de particules par kilomètre parcouru que les moteurs à essence (Figure A6).

2.1. Composition des gaz d'échappement de moteur diesel

Les gaz d'échappement de moteur diesel sont un mélange complexe composé principalement de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Ils contiennent également des traces de soufre, de zinc, de phosphore, de calcium, de fer, de silicium et de chrome, ainsi que des fractions non extractibles et extractibles ([Chan et al., 2007](#) ; [Westerholm & Egeback, 1994](#) ; [Williams & Chock, 1981](#)) (Figure A4 et Encadré 1).

La partie non extractible (aussi appelée phase solide) est majoritairement composée de particules carbonées primaires sphériques avec un noyau de carbone élémentaire de 10 à 30 nm de diamètre ([Liatì & Dimopoulos Eggenschwiler, 2010](#) ; [Bernard et al., 2014](#)). Ces particules peuvent former des agrégats d'un diamètre allant de 60 à 100 nm ([Carpenter et al., 1979](#) ; [Cheng et al., 1984](#)). La taille de ces particules leur confère des propriétés physico-chimiques particulières ([Linse et al., 2007](#)), qui leur permettent d'interagir avec d'autres toxines présentes dans l'environnement, et de franchir les barrières biologiques et atteindre les organes par voie systémique ([Oberdörster et al., 2002](#) ; [Genc et al., 2012](#)).

Si les mécanismes de formation de ces particules au cours de la combustion sont complexes et restent mal connus, la voie principale de formation des particules serait la pyrolyse du carburant non brûlé et des huiles de lubrification, suivie des réactions de polymérisation et autres processus physico-chimiques ([Steiner et al., 2016](#)).

Cette phase solide contient également des métaux dont des métaux oxydés (tels que le zinc, le fer ou le magnésium) provenant des additifs des huiles de lubrification et du carburant, ainsi que de l'usure du moteur ([Mayer et al., 2010](#)). Lors de la combustion, ces additifs peuvent subir divers processus induisant leur intégration à la surface des particules les rendant ainsi chimiquement actives ([Bernard et al., 2014](#)). Par exemple, l'oxydation partielle des HAP, qui sont présents à la surface des particules, peut produire

des dérivés réactifs de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (Geller et al. 2006; Antinolo et al., 2015).

La partie extractible (aussi appelée phase gazeuse) est composée à 99% de gaz inorganiques comme l'azote, la vapeur d'eau et l'oxygène. Le pourcentage restant est composé de gaz toxiques tels que le 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 molécules carbonées comme les HAP et les composés aromatiques hétérocycliques (CAH). La présence des composés organiques sous forme gazeuse dépend de la température de l'échappement ainsi que du poids moléculaire du composé.

Il est à noter que la composition des phases dépend fortement du type de moteur, ainsi que du type de carburant et d'huile de lubrification et leurs additifs (Giakoumis et al., 2013 ; Imtenan et al., 2014 ; Popovicheva et al., 2015). De plus, pour la plupart de ces composés organiques, il est difficile de savoir s'ils appartiennent à la fraction gazeuse ou condensée, leur attribution dépendant de l'équilibre entre la condensation et l'évaporation, de la concentration d'échappement et de la disponibilité des noyaux et des surfaces pour la condensation.

2.2. Risques particuliers liés au diesel

Récemment, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), qui est l'agence pour le cancer de l'organisation mondiale de la santé (OMS), a classé les gaz d'échappement des moteurs diesel parmi les produits cancérigènes "certains" pour les humains (WHO, 2014).

En outre, selon 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 des oxydes d'azote (NOx) et des particules fines et ultrafines qui sont pointées comme dangereuses pour la santé. La toxicité des émissions des moteurs diesel semble ainsi essentiellement liée à leur phase particulaire et gazeuse. En effet, une étude publiée en Septembre 2017 dans la revue Environmental Research Letters par Jonson et collaborateurs (2017) estime que plus de 400.000 décès prématurés par an en Europe sont associés aux niveaux d'exposition actuels de PM_{2.5} et 15.000 à ceux d'ozone, ce qui est en accord avec des données européennes publiées en 2016 par l'EEA (2016b). Il est à noter que, sur ces décès prématurés, seuls 10.000 seraient attribuées directement aux émissions de NOx issus des moteurs diesel.

Dans les grandes agglomérations, le trafic routier peut représenter jusqu'à 30% des émissions en particules fines, et plus de 60% des oxydes d'azote avec les véhicules diesel responsables de la quasi-totalité de ces émissions (95 % des émissions de particules et de dioxyde d'azote proviennent des moteurs diesel). De plus, les véhicules particuliers avec une motorisation au diesel sont ceux qui émettent le plus de particules

primaires du parc roulant urbain français en 2010 ([ADEME, 2012](#)), ces particules représentant jusqu'à 87% des émissions particulières liées au trafic automobile.

Pour réduire l'impact du trafic routier sur la qualité de l'air, en complément de la diminution du trafic, les véhicules diesel ont ainsi été équipés de filtres à particules. Cependant, les filtres ne bloquent que les particules les plus grosses ; les particules de petite taille ne sont donc pas retenues et continuent à être émises. Ces particules ultrafines (d'un diamètre inférieur à 0,1 μm) constitueraient donc 90 % des particules émises par les moteurs diesel de dernière génération ([Bourdrel et al., 2017](#), [Kittelson, 1998](#)).

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 A7 : 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 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 [AirParif, 2008, 2016](#) ; modifié par [Valentino et al., 2016b](#).

3. La pollution atmosphérique est un enjeu de santé publique

3.1. Réglementations et recommandations d'émission

Des politiques publiques ont été rapidement mises en place pour surveiller, informer et mettre en œuvre des plans d'action dans le but de contrôler et réglementer les niveaux de pollution atmosphérique. En France, Air Parif, association agréée par le ministère de l'Environnement pour la surveillance de la qualité de l'air en région Île-de-France, définit des « valeurs limites », des « seuils d'information, de recommandation et d'alerte » et des « objectifs de qualité » (Figure A7).

3.1.1. A l'échelle mondiale

En 2005, l'OMS a publié une synthèse présentant les valeurs seuils au-delà desquelles la pollution atmosphérique est considérée comme nuisible pour la santé (OMS, 2005). Ces recommandations sont en cours de révision avec un objectif de publication en 2020. Cette synthèse stipule que la mortalité due à la pollution de l'air pourrait être réduite de 15 % si la concentration atmosphérique en PM₁₀ était réduite de 70 à 20 µg/m³.

Dans l'attente de ces nouvelles recommandations, les valeurs seuils actuelles publiées par l'OMS pour la fraction particulaire sont de 20 µg/m³ en moyenne annuelle et 50 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM₁₀, et 10 µg/m³ en moyenne annuelle et 25 µg/m³ en moyenne journalière pour les PM_{2.5}.

L'OMS a également établi des valeurs réglementaires pour d'autres constituants de la pollution atmosphérique (OMS, 2005).

3.1.2. A l'échelle européenne et française

Les réglementations appliquées en Europe, et particulièrement en France, sont plus restrictives que les recommandations mondiales, et indiquées dans la Figure A7.

De plus, la fraction particulaire PM_{2.5} est soumise à des objectifs supplémentaires de réduction, calculés à partir des concentrations relevées les années précédentes.

Les directives européennes relatives à la qualité de l'air ont fixé successivement des niveaux maximaux de particules admissibles dans l'air ambiant de 50 µg/m³ pour les PM₁₀ depuis 1999 (directive 1999/30/CE) et 80 µg/m³ pour les PM_{2.5} depuis 2008 (directive 2008/50/CE) et qui sont plus élevés que ceux préconisés à l'échelle mondiale. 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 directives sur la qualité de l'air émises par l'OMS (WHO, 2013). Il est intéressant de noter que, si la majorité des polluants atmosphériques sont suffisamment étudiés pour être réglementés, certains ne sont soumis à aucune recommandation, tels que les

nanoparticules ou les HAP. Pourtant, ces derniers sont au cœur de questionnements récents vis-à-vis de leur toxicité potentielle.

3.2. Enjeux sanitaires et environnementaux

Au niveau mondial, la pollution de l'air est désormais la première cause environnementale de mort prématurée, devant les problèmes d'hygiène et les problèmes d'approvisionnement en eau potable. En France, le coût sanitaire et environnemental de la pollution atmosphérique est évalué de 70 à 100 milliards d'euros par an par la Commission d'enquête du Sénat dans son rapport remis en 2015. L'Agence nationale de santé publique a estimé en 2016 son impact sanitaire à 48 000 décès prématurés par an, ce qui correspond à 9 % de la mortalité en France et à une perte d'espérance de vie.

3.2.1. Risques sanitaires liés à l'exposition

Les constats récents issus de données épidémiologiques concernant les risques sanitaires liés à la pollution atmosphérique sont très alarmistes, même s'il paraît difficile de faire un lien causal entre une pathologie et une exposition particulière à un polluant de l'air spécifique. En effet, dans la plupart des cas, la synergie des effets rend indissociables les conséquences propres à un seul composé.

Ceci étant dit, ces 20 dernières années, l'augmentation de cas pathologiques entraînant une mortalité précoce a été mise en relation avec certains phénomènes polluants. En 2005, en Europe, on recensait environ 400.000 décès prématurés liés à la pollution atmosphérique, dont 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'axes routiers présentant des niveaux de trafic importants. De plus, 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 enregistrés dans le monde ([WHO, 2014](#))).

De fait, la pollution de l'air favorise le développement de certaines pathologies chroniques graves. Ainsi, les données épidémiologiques ont clairement mis en évidence des effets de la pollution liée au trafic automobile, et plus particulièrement de la phase particulaire, sur les systèmes respiratoire et cardiovasculaire ([Bai et al, 2007](#) ; [Ostro et al, 2006](#) ; [Pope et al, 2004](#)). À titre d'exemple, le programme CAFE (Clean Air For Europe) de la Commission Européenne ([CAFE, 2005](#)) a estimé qu'en France 42.000 décès par an étaient en relation avec l'exposition chronique aux particules d'origine anthropique (notamment les PM₁₀ et PM_{2.5}). Le projet Aphekom ([Pascal & Medina, 2011](#)), coordonné par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) et mené dans 25 villes européennes de 12 pays, a rendu public en 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 ([Falcon-Rodriguez et al., 2016](#); [Kim et al., 2015](#) ; [Ostro et al., 2006](#); [Xing et al., 2016](#)).

En outre, des données épidémiologiques récentes ont également suggéré qu'une exposition à la pollution atmosphérique pouvait jouer un rôle dans l'émergence 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 ([Calderón-Garcidueñas et al, 2015](#) ; [Costa et al, 2014](#) ; [Genc et al, 2012](#)).

3.2.2. Objectifs et actions pour limiter les rejets polluants dans l'air

Malgré la prise de conscience des dangers liés à la pollution 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 automobiles nationales et internationales fixant les normes des émissions de polluants par les véhicules à la commercialisation, ont été mises en place très tôt. Ainsi, la première réglementation des émissions de gaz d'échappement date de 1967 et a été établie par l'agence de protection de l'environnement américaine (USEPA). Les pays en développement suivent les normes européennes ou américaines, dont les seuils ne cessent d'être durcis, même si tous les composés présents dans les émissions des moteurs diesel ne sont pas réglementés.

En Europe, les conformités sont établies à partir de la collecte des gaz d'échappement issus de cycles modaux (dont le NEDC, *New European Driving Cycle*, mis en place en 1973). Il s'agit d'un ensemble d'accélération linéaires et de périodes de vitesse constante appliquées sur les moteurs en cycle ville et route à 33 km/h de moyenne (ce qui est peu représentatif de la réalité). Il est remplacé depuis 2017 par le test WLTP (*Worldwide harmonized Light vehicles Test Procedures*), plus réaliste, mesurant les rejets de CO₂ et de certains polluants (NOx, CO, hydrocarbures et particules fines).

Aux États-Unis, 5 cycles différents sont combinés : un cycle de représentation de la conduite en ville, un cycle d'évaluation de la consommation de carburant sur autoroute, un autre simulant une conduite plus agressive, ainsi que deux cycles réalisés en conditions de température extérieure élevée ou négative.

Si d'importants progrès sont à noter concernant les polluants classiques de l'air ambiant, notamment liés aux activités industrielles et au trafic, une vigilance particulière

est affichée par rapport aux nanoparticules (NP), pour lesquelles l'exposition et les effets sur la santé et le bien-être de l'individu sont encore mal connus ([IFEN, 2006](#)). Dans un avis rendu en Juillet 2017, l'ANSES insiste sur la nécessité de compléter et de pérenniser l'acquisition de données dans l'air ambiant pour les particules ultrafines et le carbone suie, et d'assurer un suivi particulier sur le long terme sur ces deux substances, compte tenu de leur abondance et de leur enjeu potentiel en terme 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.

A l'échelle européenne, le plan « Air pur pour l'Europe », inscrit dans le programme « Clean Air For Europe (CAFE) », a pour but 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. Il a posé en cela les bases de la première action annoncée dans le 6^{ème} Programme d'Action pour l'Environnement (PAE) qui a établi un cadre stratégique pour la politique environnementale de la Commission européenne jusqu'en 2012. Depuis, des mesures fortes ont été déclinées avec notamment la mise en place de « zones à circulation restreinte » selon les certificats qualité de l'air (Crit'Air) des véhicules, mais également, au regard des enjeux locaux, d'autres mesures exemplaires dans le domaine résidentiel, industriel ou agricole dans 25 communautés de communes d'ici 2020 en France.

Partie II – La pollution de l'air pourrait endommager le cerveau de l'enfant avant même sa naissance

<u>1</u>	Etudes sur cohortes humaines.....	15
<u>2</u>	Etudes sur modèles animaux.....	23

Encadré 2 : Anatomie du Système Nerveux Central (SNC)

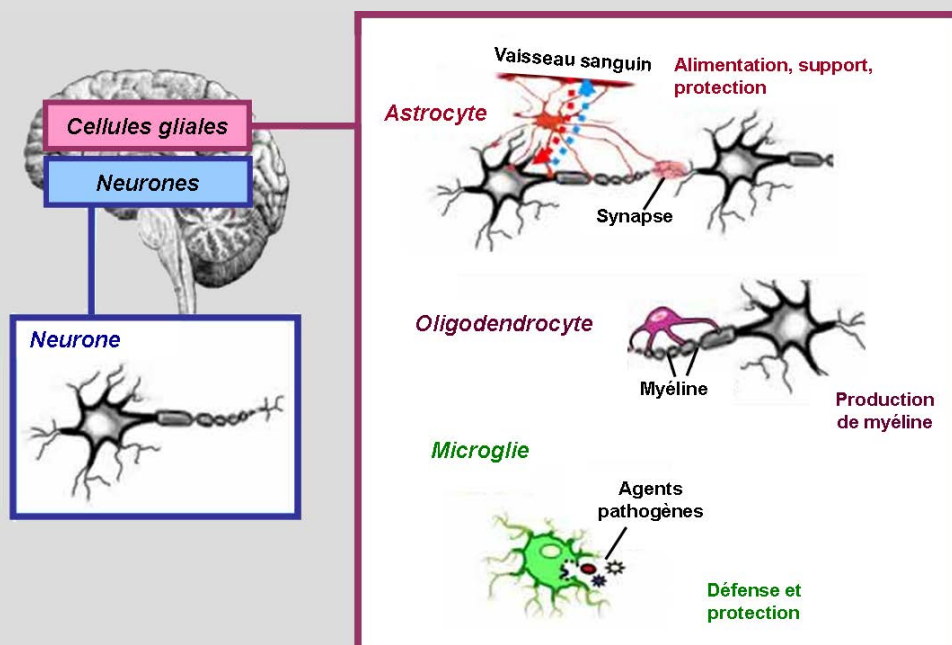
Le système nerveux central (SNC) comprend le **cerveau** et la **moelle épinière**, et est constitué de réseaux organisés de deux types cellulaires : les neurones et les cellules gliales.

Les **neurones** sont des cellules excitables capables d'échanger des informations *via* un système de communication électrique (transmission de «potentiels d'action») et chimique. Les points de contact au niveau desquels l'échange d'information a lieu sont appelés « synapses ».

Dans un neurone, les *dendrites* reçoivent l'information chimique, laquelle est convertie (*via* des récepteurs protéiques) en signal électrique, et transmis au *corps cellulaire*. Du corps cellulaire émane l'*axone*, qui à son tour joue le rôle de transmetteur de l'information *via* l'envoi de signaux électriques à des cellules adjacentes au niveau de terminaisons dites synaptiques.

Les **cellules gliales** comprennent de nombreux sous-types, de structures très distinctes : astrocytes, cellules microgliales et oligodendrocytes.

Elles assurent selon les types un support trophique & énergétique, élaborent la gaine de myéline ou jouent un rôle immunitaire.



Le SNC est également constitué d'un **système vasculaire** qui assure l'irrigation sanguine du tout, et de **liquide céphalo-rachidien (LCR)** qui circule dans des zones spécialisées et dans lequel baigne l'ensemble du SNC afin d'absorber et amortir les mouvements ou chocs qui risqueraient de l'endommager.

1. Etudes sur cohortes humaines

Au-delà 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](#)), de plus en plus de données aussi bien épidémiologiques qu'expérimentales montrent clairement que l'inhalation chronique de particules dont celles générées par les moteurs diesel peut constituer une menace pour le cerveau en atteignant les différents types cellulaires qui le constituent (Encadré 2) et ce, malgré les différentes barrières de protection et les systèmes d'élimination des xénobiotiques ([Abbott et al., 2006](#)). En effet le cerveau reste vulnérable aux effets de ce type de pollution du fait d'une inflammation chronique, d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et d'une activation de la microglie que l'inhalation des particules est susceptible d'induire, contribuant ainsi à l'émergence de neuropathologies ([Block et al., 2012](#) ; [Block & Calderón-Garcidueñas, 2010](#) ; [Calderón-Garcidueñas, 2002](#) ; [Genc et al., 2012](#) ; [Hartz et al., 2008](#)).

1.1. Conséquences d'une exposition chronique directe à la pollution de l'air

Les études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition directe des individus à la pollution atmosphérique sont résumés dans l'Annexe 1, Tableau 1a. Les premiers travaux expérimentaux mettant en évidence des effets neurotoxiques ont été réalisés par [Calderón-Garcidueñas](#) et collaborateurs. Ils ont réalisé des autopsies d'enfants et de jeunes adultes résidant à Mexico et mis en évidence une augmentation significative de la COX₂, de l'IL_{1β} et de CD₁₄ dans différentes régions cérébrales incluant le bulbe olfactif, le cortex frontal, la substance noire et le nerf vague, ainsi qu'une rupture de la BHE et de la barrière épithéliale des voies respiratoires, et une inflammation tant au niveau systémique que cérébral ([Calderón-Garcidueñas et al., 2001, 2008b](#)). Ces études ont également permis de mettre en évidence une accumulation de particules ultrafines dans l'épithélium nasal, ainsi qu'à différents niveaux du bulbe olfactif incluant des neurones, des cellules endothéliales et les membranes basales des artéioles. De plus, ces auteurs ont montré la présence de plaques bêta-amyloïdes et de corps de Lewy dans les mêmes régions du cerveau (Figure A8) ([Calderón-Garcidueñas et al., 2010](#)).

L'ensemble de ces travaux indique donc la possibilité pour les particules liées à la pollution automobile de pénétrer dans l'épithélium nasal et de pouvoir ainsi migrer plus ou moins facilement vers le système nerveux central (SNC) pour activer des réponses immunitaires qui elles-mêmes peuvent contribuer à la mise en place de neuropathologies (Figure A9) ([Calderón-Garcidueñas et al., 2003, 2008a, 2008b, 2010, 2014](#)).

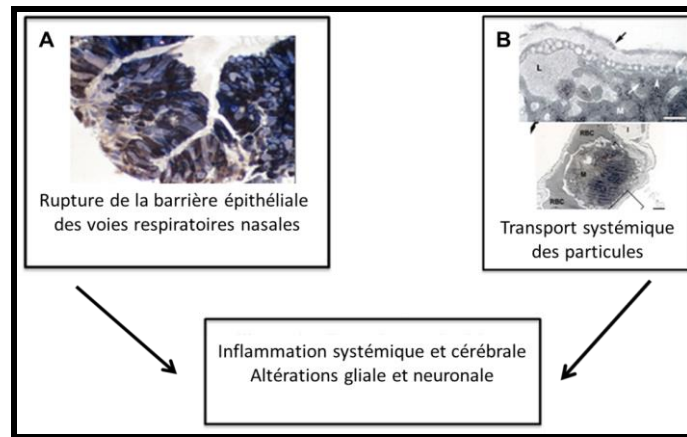
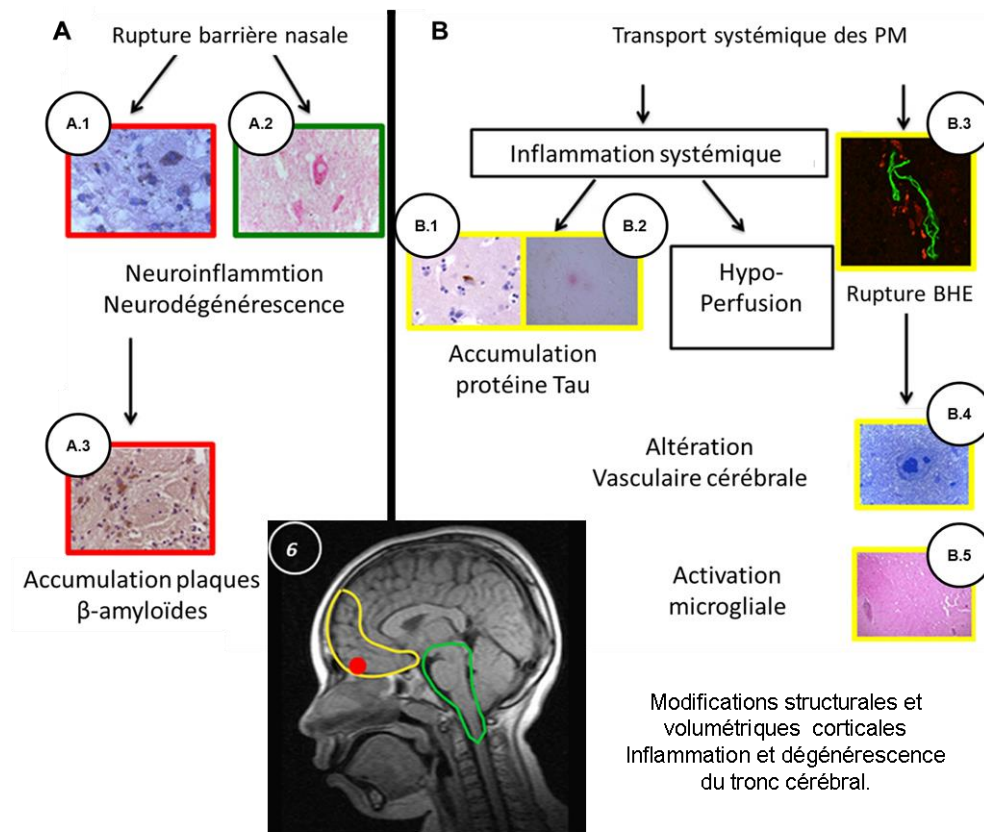


Figure A8 : Image représentant deux voies d'entrée possibles des particules au cerveau, et les possibles atteintes neuronales associées. De nombreuses voies d'entrée possibles des particules au cerveau existent (Bencsik et al., 2018), mais sur cette image ne sont présentées que deux voies, évoquées dans Calderón-Garcidueñas et al, 2014. Les particules peuvent atteindre le cerveau *via* la voie olfactive (A) ou *via* la voie systémique (B), et ainsi contribuer à la mise en place de diverses atteintes neurophysiologiques et neurocomportementales. Les divers effets biologiques liés à (A) et (B) sont représentés sur la figure A9. Adapté de Calderón-Garcidueñas et al, 2014.



Emergence de problèmes cognitifs et comportementaux
 Réduction du QI, troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité,
 développement de troubles du spectre autistique

Figure A9 : Atteintes neurologiques suspectées d'être associées à l'exposition directe aux particules. L'exposition directe aux particules mène à leur accumulation dans diverses structures cérébrales (A.1), impliquant une rupture de la BHE (B.3) et des altérations vasculaires cérébrales (B.4 et B.5), ainsi qu'une accumulation de protéine α -synucléine (A.2), de plaques β -amyloïdes (A.3 et B.2, en rouge) et une neurodégénérescence neurofibrillaire (B.1). Ces altérations semblent mener à des modifications importantes des circuits neuronaux pouvant contribuer à l'émergence de désordres comportementaux. La couleur du contour des images correspond à l'origine tissulaire de ces dernières. Jaune = cortex préfrontal et entorhinal ; Rouge = bulbe olfactif ; Vert = tronc cérébral. Adapté de Calderón-Garcidueñas et al, 2014 et Guxens et al., 2018.

De façon intéressante, les travaux de Maher et collaborateurs (2016) ont mis en évidence la présence de nanoparticules de magnétite (présentes dans l'air pollué, et étant impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)) dans des échantillons de cortex frontal des résidents de Mexico de Manchester.

Au plan des effets, peu d'études épidémiologiques ont évalué les conséquences neuropsychologiques et neurophysiologiques de l'exposition de l'adulte à des polluants atmosphériques, les quelques données existantes restant également difficiles à interpréter (Annexe 1, Tableau 1a). A titre d'exemple, les études de Chen et collaborateurs (2009), portant sur les données issues de l'enquête nationale sur la santé et la nutrition de la population étasunienne (NHANES III), ont montré que l'augmentation des niveaux d'exposition annuelle à l'ozone est associée à des performances réduites dans les tests de mémoire et d'attention chez l'adulte de 20 à 59 ans. En revanche, aucune association entre l'exposition aux PM₁₀ et d'éventuels troubles cognitifs et comportementaux n'a été mise en évidence du fait des ajustements sociodémographiques mis en place dans les modèles statistiques. Récemment, les travaux de Kioumourtzoglou et collaborateurs (2016) ont mis en évidence un possible lien entre l'exposition à long terme aux PM_{2.5} et l'hospitalisation de patient atteints de maladies neurodégénératives de type Alzheimer, Parkinson et démence chez les personnes âgées.

Une autre étude, portant sur des femmes âgées de 68 à 79 ans, a montré une réduction significative de la fonction cognitive chez celles de moins de 74 ans vivant à proximité d'une route très fréquentée (Ranft et al., 2009) sans qu'une relation directe avec l'exposition aux PM₁₀ ait pu être montrée. Les travaux de Power et collaborateurs (2010), qui ont porté sur des hommes âgés de 51 à 97 ans, ont souligné un lien possible entre l'exposition au carbone élémentaire (BC) et une réduction significative de la fonction cognitive.

Il est à noter que les travaux de Crüts et collaborateurs (2008) qui font partie des rares études basées sur une exposition contrôlée aux gaz d'échappement de type diesel (DE) ont montré sur un échantillonnage faible d'hommes volontaires âgés de 18 à 39 ans, une augmentation significative de l'activité des ondes rapides ($\beta 2$) du cortex frontal gauche pendant et après l'exposition aux gaz d'échappement, suggérant une réponse retardée du cortex frontal liée à l'exposition.

Dans l'ensemble, l'exposition à la pollution atmosphérique liée au trafic automobile semble entraîner des troubles cérébraux d'ordre cognitif tels que ceux observés chez l'adulte et les personnes âgées. Néanmoins, le lien de causalité entre les deux reste difficile à déterminer, en particulier du fait de l'ajustement des modèles statistiques d'analyse, mais également des effets confondants difficiles à dissocier.

Encadré 3 : Le cerveau en développement est particulièrement sensible

Le cerveau se développe à partir de quelques cellules le long de l'ectoderme dorsal du fœtus, pour être finalement composé de plusieurs milliards de cellules précisément localisées, hautement spécialisées, et interconnectées, ce qui en fait une **structure très complexe** sur le plan de son organisation et de son fonctionnement, *via* de **nombreux processus, précisément contrôlés et finement régulés** dans le temps (prolifération cellulaire, migration, différenciation, synaptogenèse, apoptose, myélinisation...).

Cette complexité rend le cerveau en développement plus **vulnérable** que le système nerveux mature aux effets des perturbations survenant dans son environnement au cours de cette période, modifications qui peuvent alors persister à long terme en dépit de ses capacités d'adaptation et de régulation (Tilson, 1998 ; Walker, 2005). De plus, le métabolisme de l'organisme en développement est encore **immature**, ce qui induit de moins bonnes capacités de détoxification (Grandjean & Landrigan, 2006).

Concernant la barrière-hémato-encéphalique (BHE), celle-ci n'est mature que vers 6 mois après la naissance (Grandjean & Landrigan, 2006), ce qui rend le cerveau fœtal **plus fragile** face à certains agents d'origine maternelle (Dorman et al., 2006). De plus, certaines enzymes impliquées dans le contrôle du stress oxydant ne s'expriment 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).

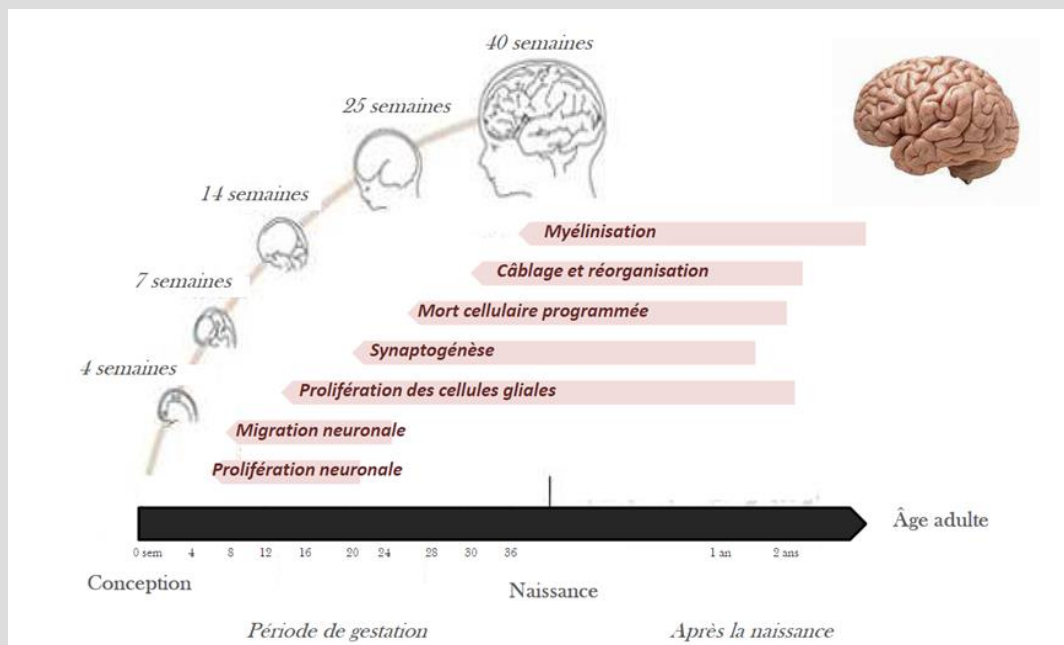


Schéma représentant le développement cérébral de la conception à l'âge adulte. Image issue du cours de Mme. Marion Mortamais (<https://autisme-ressources-lr.fr/spip.php?action=telecharger&arg=2025&type...pdf>).

Cependant, ces constats récurrents renforcent l'idée que l'exposition à la pollution atmosphérique pourrait faire partie des facteurs de susceptibilité menant à l'émergence de troubles cérébraux selon les autres facteurs de vie auxquels ce type d'exposition peut être associé.

La situation est différente si l'on considère l'exposition chronique directe de l'enfant et du jeune adolescent. En effet, les données épidémiologiques indiquent clairement dans cette population une vulnérabilité accrue à la pollution de l'air, et sa possible participation dans l'émergence de troubles neurodéveloppementaux, tels que les troubles du spectre autistique et les troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité (Becerra et al, 2013 ; Calderón-Garcidueñas et al, 2016 ; Freire et al, 2010 ; Guxens et al, 2012, 2014 ; Harris et al, 2016 ; Lanphear et al, 2015 ; Newman et al, 2013 ; Siddique et al, 2011).

Contrairement au cerveau adulte, le cerveau en développement comprend un réseau cellulaire en expansion qui n'est pas encore protégé par une BHE entièrement fonctionnelle (Encadré 3). De plus, seule une régulation stricte de l'équilibre entre différents événements cellulaires incluant la prolifération, la migration, la différenciation et la mort des cellules permettant de consolider les réseaux nerveux et d'établir de nouvelles connexions. Pour ces raisons, le cerveau en développement est considéré comme plus sensible à l'exposition aux substances toxiques présentes dans l'environnement que le cerveau adulte.

Différents articles de revue, dont ceux publiés en 2012 par Guxens et Sunyer d'une part et Block d'autre part, récapitulent les études portant sur les effets neuropsychologiques de la pollution atmosphérique chez les enfants comparativement à l'adulte. Les conclusions de ces revues suggèrent que la pollution de l'air peut entraîner des lésions de la substance blanche et des vaisseaux cérébraux associées à des troubles cognitifs chez l'adulte et la personne âgée, mais aussi des troubles du comportement chez l'enfant avec un rôle modulateur de la fenêtre et du type d'exposition (Figure A9) (Block et al., 2012; Calderón-Garcidueñas et al., 2003a, 2008a, 2008b, 2010, 2014 ; Guxens et Sunyer, 2012).

Au regard de ces travaux décrivant une association entre exposition à la pollution et atteintes cérébrales, le principe de précaution devrait être appliqué afin de protéger la population, en particulier les enfants, en raison de leur vulnérabilité et des effets potentiels à long terme de l'exposition toxique accumulée au cours des étapes de la vie.

1.2. Conséquences d'une exposition maternelle à la pollution de l'air sur la descendance

À l'heure actuelle, différentes données épidémiologiques suggèrent également des risques neurodéveloppementaux liés à la pollution atmosphérique chez les enfants nés de mères exposées (Annexe 1, Tableau 1b).

Les premiers travaux épidémiologiques mettant en évidence ce type de lien ont été réalisés par Frederica Perera et collaborateurs (2006, 2009, 2012). Ils ont examiné les effets de l'exposition prénatale aux particules fines et leurs dérivés sur le développement du cerveau en monitorant l'exposition de 600 femmes depuis le troisième trimestre de la grossesse jusqu'à 7 ans après la naissance, dans différentes localités newyorkaises et en évaluant les capacités cognitives des enfants entre trois et sept ans nés de ces mères. Les résultats montrent une corrélation entre le niveau d'exposition aux polluants atmosphériques et l'émergence de troubles cognitifs et comportementaux chez les enfants, avec 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 également 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 façon intéressante, Edwards et collaborateurs (2010) ont confirmé les données de Perera, à savoir un lien entre l'exposition à la pollution de l'air pendant la grossesse et la réduction du QI chez l'enfant de 5 ans.

Perera et collaborateurs (2012) et Peterson et collaborateurs (2015) ont également observé des perturbations neurodéveloppementales (déficits attentionnels et hyperactivité, ADHD) chez l'enfant à différents âges (6-9 ans), ce qui a été observé dans d'autres études. En effet, Siddique et collaborateurs (2011) ont mis en évidence une association entre exposition élevée au PM₁₀ chez les enfants et l'apparition de symptômes de déficit de l'attention et de l'hyperactivité (ADHD); Newman et collaborateurs (2013), de leur côté, ont évoqué un possible lien entre une exposition élevée au BC et l'apparition de symptômes d'ADHD.

Plusieurs études épidémiologiques ont évoqué un possible lien entre un déclin du développement mental et psychomoteur chez l'enfant et l'exposition prénatale à divers polluants atmosphériques et leurs dérivés, tels que les hydrocarbures (Perera et al., 2006, 2009; Edwards et al., 2010; Lin et al., 2014), le SO₂ (Lin et al., 2014) ou le BC (Suglia et al. 2007; Harris et al., 2016). Il est à noter que pour le dioxyde d'azote (NO₂), l'association entre l'exposition et les potentielles perturbations neuropsychologiques chez l'enfant restent contradictoires; en effet, Freire et collaborateurs (2010) évoquent

une possible association entre le NO₂ et une diminution du score cognitif global et de mémoire, alors que Clark et collaborateurs (2012) n'ont pas mis en évidence une telle association. A noter, également, que plusieurs de ces travaux épidémiologiques suggèrent un lien possible entre l'exposition aux divers polluants atmosphériques et l'apparition des déficits cognitifs ou des troubles du comportement chez l'enfant, sans pour autant pouvoir déterminer la contribution individuelle de chacun de ces polluants (Becerra et al., 2013 ; Jung et al., 2013 ; Kim et al., 2018).

Finalement, Volk et collaborateurs (2013) ont montré que des enfants californiens exposés pendant la grossesse à des niveaux élevés de polluants liés à la circulation automobile présentent une susceptibilité à développer des troubles autistiques plus importante que les enfants plus faiblement exposés. Cette même association a été évoquée dans d'autres travaux (Becerra et al., 2013 ; Jung et al., 2013).

Récemment, Monica Guxens et collaborateurs (2018) ont évalué le lien possible entre l'exposition aux particules fines (dont les PM_{2.5}) au cours de la vie fœtale, et d'éventuelles modifications cérébrales morphologiques et fonctionnelles chez des enfants nés entre 2002 et 2006. Les enfants âgés 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. Les analyses d'imagerie ont 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 alors que les résultats des tests cognitifs ont révélé des modifications des fonctions exécutives de type de troubles de l'attention et d'hyperactivité. Il est à noter que ces enfants, qui ont aujourd'hui 13-14 ans, continuent à être suivis pour étudier leur devenir à plus long terme en lien avec l'exposition à la pollution atmosphérique lors de la grossesse de leurs mères.

L'ensemble de ces travaux suggère que l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique affecte le développement du cerveau au stade fœtal (avec des conséquences dès le jeune âge) et pourrait, *in fine*, prédisposer l'individu à des maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives plus tard dans la vie en favorisant les mécanismes physiopathologiques qui sont associés à ces maladies (Heusinkveld et al., 2016) (Figure A9). La fenêtre d'exposition (Lin, 2014), la complexité ou la concentration en polluants (Perera et al., 2006, 2009, 2012) sont des éléments déterminants.

Certains travaux illustrent en outre que le suivi longitudinal des individus au cours de leur vie est précieux pour déterminer les éléments fondateurs et la chronologie d'apparition des désordres observés ultérieurement (Perera et al., 2006, 2009, 2012 ; Harris, 2016). En effet, on ne peut pas exclure que d'autres facteurs liés à la trajectoire individuelle puissent s'ajouter et participer à l'émergence ou l'aggravation de ces atteintes

Encadré 4a : Complexité de la matière particulaire

On parle de « particules fines » au sens large, mais on néglige parfois le fait que c'est leur **composition** et leur **taille**, et donc leur **origine**, qui détermineront leur **toxicité**.

Si on schématise la composition des particules liées au trafic automobile (ci-dessous) on trouve, en leur centre, un noyau de carbone recouvert d'une couche appelée « **corona** ». La *corona* constitue l'élément le plus dangereux de la particule car c'est à ce niveau que se font les « contacts » avec les molécules et cellules de notre organisme.

Ainsi, les particules fines et ultrafines seront dangereuses de par leur taille qui leur permet de pénétrer en profondeur, de gagner le système sanguin et d'atteindre tous les organes, leur rapport surface/taille très important, ce qui va favoriser leur interaction, mais également la composition de leur corona, d'autant que cette dernière peut subir des modifications ou « **transformations** » tout le long de la durée de « vie » de la particule ([Albanese et al., 2012](#) ; [Duan et Li, 2012](#) ; [Genter et al., 2009](#); [Ruiz et al., 2015](#)).

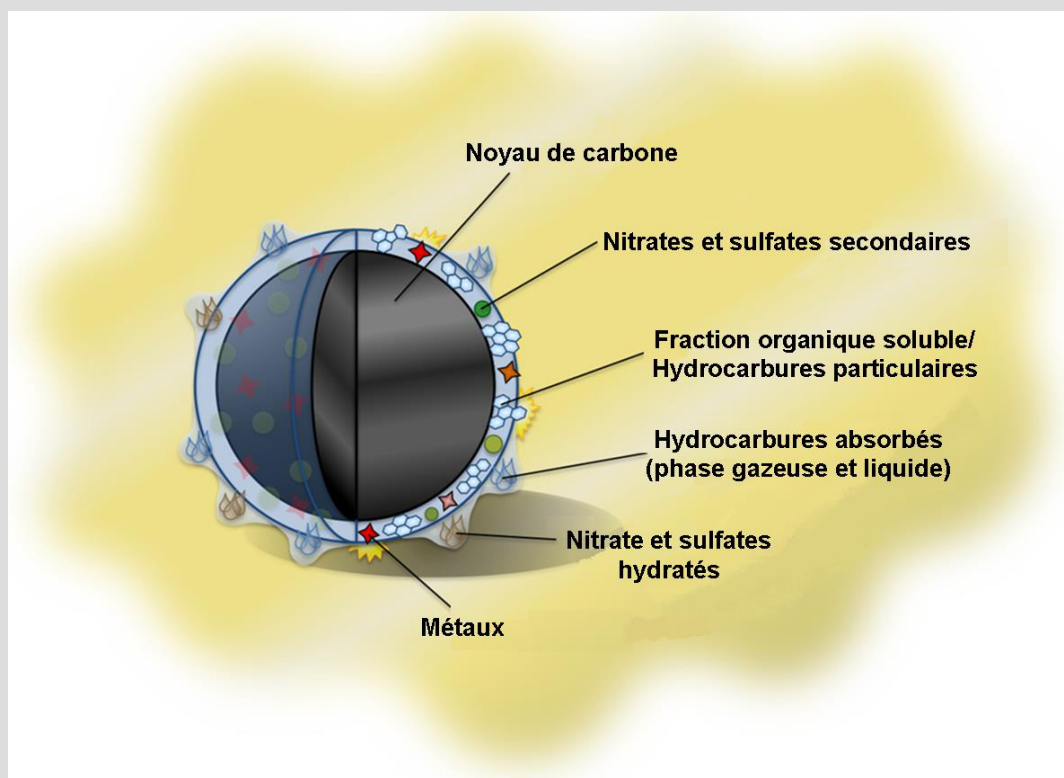


Schéma fournissant un exemple de la composition complexe de particules ultrafines dans les gaz d'échappement des véhicules. Ces particules ont souvent un noyau en carbone recouvert d'un large éventail d'espèces chimiques, y compris des métaux (responsables du stress oxydatif) et des hydrocarbures organiques (classés cancérigènes de type 1). Le détail n'est pas à l'échelle. Adapté de [Stone et al., 2017](#).

1.3. La caractérisation de l'exposition maternelle aux polluants atmosphériques reste complexe

Malgré la multiplication des études épidémiologiques suggérant une relation entre pollution gestationnelle et développement du système nerveux, les travaux résumés ci-dessus présentent plusieurs limites qui rendent difficiles les comparaisons et la possibilité de conclure sur les mécanismes par lesquels la pollution atmosphérique et plus particulièrement la phase particulaire altère le développement du SNC dans un contexte d'exposition indirecte via l'organisme maternel ([Heusinkveld et al, 2016](#)).

Nous allons détailler ci-dessous les raisons pour lesquelles il est difficile d'établir un lien direct entre inhalation gestationnelle et neurotoxicité de la descendance chez l'homme.

1.3.1. Facteurs de variation individuelle

Lorsqu'on considère la toxicité cérébrale d'une substance pour le jeune, il est nécessaire de prendre en compte un grand nombre de facteurs dont la particularité tant au plan physiologique, biologique que comportemental contribue à une sensibilité unique de l'organisme en développement ([Graeter & Mortensen, 1996](#)). Les effets produits par un composé potentiellement neurotoxique dépendent de plusieurs facteurs parmi lesquels le stade de développement pendant lequel l'exposition a lieu, la période, la durée et la dose d'exposition, la possibilité d'activation métabolique d'intermédiaires réactifs, la distribution de la molécule et/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 composé potentiellement neurotoxique peuvent fortement varier d'un individu à l'autre comme d'un produit à l'autre ([Mendola et al., 2002](#)).

1.3.2. Nature et réactivité des particules

Différents travaux de toxicologie avec les nanomatériaux ont permis de mieux comprendre le rôle des caractéristiques physico-chimiques des particules dans leur toxicité, y compris des facteurs liés à la taille et à la surface, tels que la solubilité, la charge, la composition, le revêtement et l'agglomération/agrégation ([Albanese et al., 2012](#) ; [Duan et Li, 2013](#) ; [Genter et al., 2009](#); [Ruiz et al., 2015](#) ; [Yokel, 2016](#)). Ceci suggère que les particules ambiantes pourraient avoir des effets variés sur la santé, ces derniers pouvant être (en partie) liés au revêtement des nanoparticules ([Stone et al., 2017](#)) (Encadré 4a). Ce qui se trouve à la surface de la particule (appelée « **corona** ») pourrait jouer un rôle crucial dans le comportement des nanoparticules en contact avec un milieu biologique complexe. La nature des protéines se liant à la surface des particules affecterait donc les propriétés de ces dernières, guidant ainsi leurs interactions avec les tissus (permettant l'endocytose ou non), et participant au processus de

Encadré 4b : Marqueurs de l'exposition à la pollution atmosphérique utilisés dans les études épidémiologiques

Afin d'estimer l'exposition humaine à la pollution atmosphérique, on mesure la concentration atmosphérique en différents polluants et d'autres paramètres :

- Oxydes d'azote (NO, NO₂, NO_x)
- PM₁₀
- PM_{2.5}
- Carbone suie
- HAP
- SO₂
- O₃
- Benzène
- Densité du trafic routier
- Distance entre le lieu de résidence et une zone de trafic routier dense.

translocation d'un compartiment biologique à l'autre. Ainsi, les couronnes peuvent agir non seulement sur la biodistribution des nanoparticules, mais également sur leurs propriétés fonctionnelles, bénéfiques ou toxiques pour l'organisme.

1.3.3. Doses d'exposition

Diverses approches sont proposées pour permettre l'évaluation des concentrations atmosphériques en polluants au moment de l'exposition et relier ainsi les effets observés à l'un ou l'autre des constituants de la pollution atmosphérique (Encadré 4b). Le plus souvent, l'exposition est caractérisée en utilisant des combinaisons de modèles de dispersion qui sont des modèles mathématiques simulant la dispersion des polluants atmosphériques. Ces derniers prennent en compte l'adresse postale des femmes enceintes et les relient avec les données de surveillance environnementale relatives aux concentrations atmosphériques en polluants émis localement.

Par ailleurs, l'utilisation de boîtiers de mesure permet l'évaluation spécifique de la concentration d'un polluant atmosphérique pris comme indicateur de la pollution (par exemple, le benzène). Ils mesurent la concentration à intervalles réguliers et permettent ainsi la caractérisation précise de l'exposition maternelle ([Slama et al. 2009](#)). Cependant, peu d'études expérimentales ont permis d'étudier les effets de l'exposition d'adultes sains volontaires aux gaz d'échappement de moteur diesel dans des conditions contrôlées ([Mills et al. 2011](#)).

1.3.4. Effets cocktail

La contribution individuelle des divers polluants de l'air sur la mise en place des neuropathologies reste à être déterminée ; ceci en raison de potentiels effets synergiques. Concernant les travaux mettant en place les combinaisons d'expositions, les données demeurent inadéquates voire insuffisantes pour identifier à coup sûr le ou les composés associés aux atteintes (Tableau A1). Par exemple, en raison du nombre réduit d'études ou de la faible cohérence des résultats entre les diverses études, il est possible que les associations observées chez l'enfant puissent être liées à leur appartenance ethnique, culturelle et/ou socioéconomique ([Kristiansson et al., 2015](#) ; [Perera et al., 2009](#)).

Globalement, l'hétérogénéité des études d'exposition (méthodes utilisées, application de modèles individuels par rapport à des modèles multi-polluants pour démêler des éventuels effets synergiques) et l'évaluation des résultats (définition des cas, instruments utilisés, dépistage en fonction des outils de diagnostic) rendent difficile la possibilité de conclure à l'existence d'un lien de causalité directe entre la pollution de l'air ambiant et l'émergence de neuropathologies. A titre d'exemple, les travaux de Perera et collaborateurs ([2009](#)) et d'Edwards et collaborateurs ([2010](#)), lesquels ont utilisé le même schéma et les mêmes mesures pour l'exposition à la pollution de l'air

Tableau A1. Synthèse des résultats issus des données épidémiologiques.

	UFPM	PM2.5	PM10	HAPs	BC	NOx	O ₃	CO	SO ₂
Développement cognitif et psychomoteur									
Quotient Intellectuel (QI)									
Fonctions exécutives									
Mémoire									
Capacités motrices visuelles									
Compétences académiques									
Perturbations neurodéveloppementales									
Troubles du spectre autistique (ASD)									
Déficit attentionnels et hyperactivité (ADHD)									

BC : Carbone élémentaire (Black carbon) ; **CO** : Monoxyde de carbone ; **HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; **NOx** : Oxydes d'azote ; **O₃** : Ozone ; **PM** : Matière particulaire ; **SO₂** : Dioxyde de soufre ; **UFPM** : Matière particulaire ultrafine. **Suffisant** : La plupart des études signalent une association et peuvent permettre de conclure à un possible lien de causalité ; **limitées** : Plusieurs études indiquent une association, mais le niveau de preuve n'est pas suffisant pour permettre de conclure à une éventuelle association ; **inadéquat** : les associations ont été rapportées dans au moins une étude, mais le nombre insuffisant d'études, le manque de cohérence entre les études et/ou le manque de puissance statistique ne permettent pas de conclure quant à la présence ou à l'absence d'une potentielle association ; **insuffisante** : Aucune association ne peut être mise en évidence du fait du manque de cohérence élevé entre les études et/ou le manque de puissance statistique. **Nd** : Pas de données concluantes. Les données sur d'autres polluants (benzène ou fluorène, par exemple) ne figurent pas sur ce tableau récapitulatif.

pendant la grossesse, ont mis en évidence une association entre l'exposition aux HAP et une réduction du QI des enfants à l'âge de 5 ans, mais évoquent des niveaux de HAP observés différents. De plus, bien que ces études aient été ajustées aux facteurs de confusion potentiels, tels que les conditions socio-économiques, le QI maternel ou les doses internes de plomb, elles étaient basées sur une courte mesure de l'exposition (48 heures seulement) pour représenter toute la période gestationnelle à la pollution atmosphérique.

L'ensemble de ces données épidémiologiques révèle la difficulté à trier des informations solides sur la part des polluants atmosphériques et l'émergence de neuropathologies.

2. Etudes sur modèles animaux

Par rapport aux études épidémiologiques, les études expérimentales sur les effets des polluants atmosphériques dont les particules ont l'avantage de permettre de contrôler les conditions de l'exposition (type, durée et niveau d'exposition) et de limiter la part des facteurs de confusion liés à l'environnement qui existent dans les études humaines. De plus, elles permettent d'étudier les mécanismes mis en jeu ou de travailler sur des fenêtres d'exposition plus précises.

2.1. Conséquences d'une exposition répétée contrôlée aux particules de fumées de diesel sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu

2.1.1. Après la naissance

Les études menées sur des modèles animaux d'exposition postnatale chronique et contrôlée à des particules liées au trafic routier récapitulent les effets indésirables sur le SNC observés dans les études épidémiologiques. Les études sur les effets de l'exposition gestationnelles et postnatale au DE et aux PFD sur le développement du système nerveux central suite à une exposition directe ou gestationnelle sont résumées dans l'Annexe 1, Tableaux 2a et 2b, respectivement.

Les premiers travaux menés sur des chiens résidant dans des zones fortement polluées du Mexique ont alerté sur la nécessité de développer des modèles animaux contrôlés : ces animaux présentent des dysfonctionnements cérébraux importants impliquant une rupture de la BHE, une inflammation du tissu cérébral, ainsi qu'une accumulation de plaques bêta-amyloïdes et une dégénérescence neurofibrillaire dans plusieurs régions du cerveau ([Calderón-Garcidueñas et al., 2003, 2008a, 2016](#)). Ces résultats ont mis en évidence les altérations neurophysiologiques potentiellement causées par la pollution atmosphérique automobile de type particulaire.

Les études animales se sont ainsi intéressées à la mise en place d'expositions contrôlées au DE, et ont montré que l'exposition de souris adultes au DE altérait l'activité locomotrice, l'apprentissage et la mémoire spatiale des animaux ([Hougaard et al., 2009](#) ; [Win-Shwe et al., 2008, 2012](#)), ainsi que l'émergence de comportements impulsifs ([Allen et al., 2013](#)).

Les travaux de Yokota et collaborateurs ([2011](#)) sur l'instillation nasale de DE riche en nanoparticules chez des rats juvéniles ont mis en évidence des modifications du comportement émotionnel et de la capacité d'apprentissage, ainsi que des dérégulations du système dopaminergique dans diverses régions cérébrales chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles.

D'autre part, chez les souris exposées aux particules ultrafines (UFPM), une neuroinflammation a été observée dans le cerveau, comme en témoigne l'augmentation

des taux de diverses cytokines et de NF- κ B (Campbell et al., 2005 ; Gerlofs-Nijland et al., 2010).

Les travaux de Veronesi et collaborateurs (2005) sur des souris adultes déficientes en apolipoprotéine E ApoE^{-/-} ont montré qu'une exposition, pendant 4 mois, à des particules ambiantes concentrées provoque une dégénérescence des neurones dopaminergiques dans la substance noire des animaux ApoE^{-/-} exposés par rapport aux souris ApoE^{-/-} non-exposés. Des études biochimiques et moléculaires ont montré que l'exposition au DE semble induire un stress oxydant et l'apparition de processus neuroinflammatoires (pour revue Kraft & Harry, 2011 ; MohanKumar et al., 2008 ; Win-Shwe et Fujimakin 2011).

En outre, les travaux de Bos et collaborateurs (2012) sur des souris exposées pendant 5 jours à un environnement pollué d'un tunnel d'autoroute, ont montré une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (COX2, iNOS, eNOS et NFE2L2) dans l'hippocampe des souris exposées. Au niveau du bulbe olfactif, une diminution de l'expression de gènes liés à l'inflammation (IL_{1 α} , COX2, NFE2L2, IL₆ et BDNF) a été constatée.

Dans l'ensemble, ces travaux expérimentaux montrent que l'exposition à la pollution atmosphérique liée au trafic automobile pourrait entraîner des neuropathologies liées au stress oxydatif et aux processus inflammatoires chez les animaux adultes directement exposés, tels que ceux évoqués chez l'adulte et les personnes âgées dans les études épidémiologiques (Annexe 1, Tableau 2a). En revanche, il semble que la durée de l'exposition soit un facteur important, 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 mémoire et d'apprentissage spatial, ainsi que l'émergence de comportements dépressifs chez la souris.

2.1.2. En période gestationnelle

Peu d'études se sont intéressées aux conséquences à long terme d'une exposition survenant lors de la phase précoce du développement cérébral comme la période prénatale ainsi qu'à l'évolution des atteintes au cours de la vie de l'individu.

Les données expérimentales disponibles ont montré des altérations structurales et moléculaires des tissus neuronaux, pouvant conduire à des troubles neurocomportementaux chez l'adulte (Bolton et al, 2013 ; Hougaard et al, 2009 ; Klocke et al, 2017 ; Sugamata et al, 2006a, 2006b ; et voir revues Ema et al, 2013 ; Hougaard et al, 2015 ; Wong et al, 2015) (Annexe 1, Tableau 2b). La plupart de ces études ont été conduites chez le rongeur, en exposant quotidiennement (6 à 12h/jour) les animaux au cours de périodes gestationnelles comprises entre GD1 (1^{er} jour de gestation) et GD19 à des niveaux d'exposition en particules de l'ordre de 50-100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Chez la souris adulte, les études réalisées par Yokota et collaborateurs (2009, 2013, 2016) ont souligné que

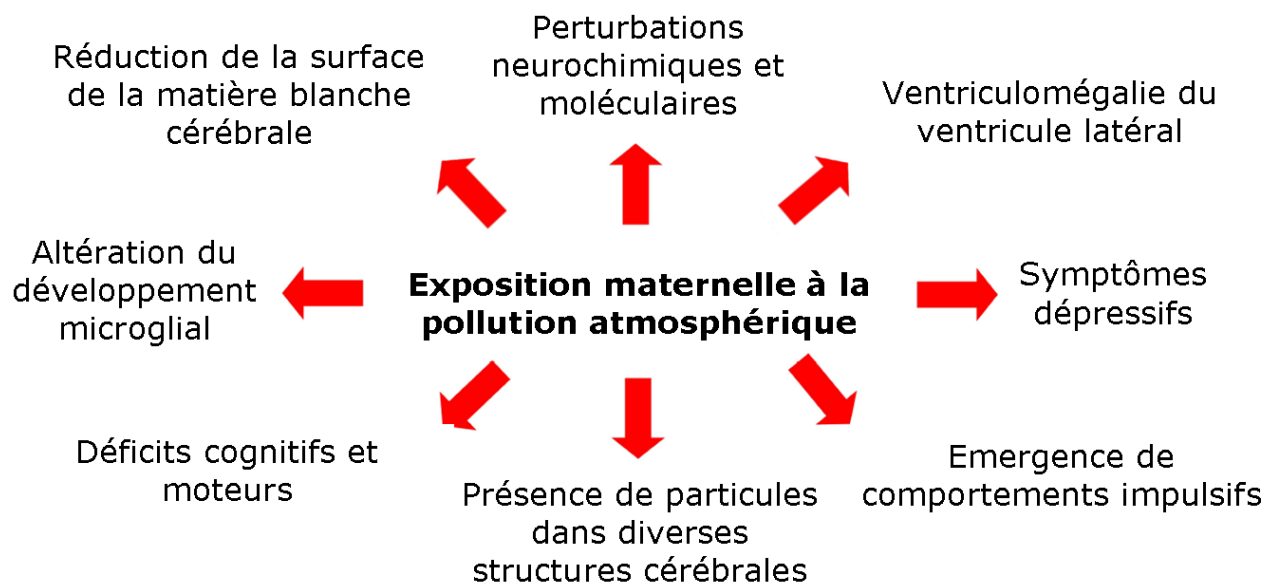


Figure A10 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD chez l'animal. Les études menées chez l'animal récapitulent les effets indésirables sur le SNC observés dans les études épidémiologiques. Inspiré des images publiées par le Dr. Michelle Block sur le site du laboratoire (<https://microgliaresearch.org/research-projects/air-pollution-and-microglia/>) et de BLock & Calderón-garcidueñas, 2010.

l'exposition aux PFD à une concentration proche des conditions naturelles ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) provoque des déficits de coordination motrice et des comportements impulsifs, liés à des perturbations de la neurotransmission monoaminergique (dopaminergique, noradrénergique et sérotoninergique) dans des régions spécifiques du cerveau tels que les noyaux du Pont, l'hypothalamus ou encore le striatum. L'exposition prénatale aux UFPM semble également altérer la différenciation *in vitro* des neurones corticaux prélevés à la naissance et provoquer un comportement dépressif chez la souris mâle adulte (Davis et al., 2013). Récemment, une altération du développement des cellules microgliales et une augmentation de leur interaction avec les neurones a été montrée chez les descendants après une exposition des femelles gestantes à $50 \mu\text{g}$ de PFD en suspension, par aspiration oropharyngée (Bolton et al., 2017) (Figure A10).

Néanmoins, il subsiste de nombreuses incertitudes concernant la nature du lien entre l'inhalation de particules et les neuropathologies associées, des données contradictoires étant publiées. En effet, une étude réalisée par Suzuki et collaborateurs (2010) suite à une exposition de $171 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PFD (8 h/jour, 5 jours par semaine, de GD2 à GD16) a révélé une augmentation du niveau de dopamine et de noradrénaline et de ses métabolites dans le cortex préfrontal (CPF) des animaux nés de mères exposées, alors que les données rapportées par Yokota et collaborateurs (2009) [dans des conditions expérimentales pourtant proches, mais de portée plus importante (8h/jour, 5 jours/semaine, de GD2 à GD17 à $1.0 \text{ mg}/\text{m}^3$)] ne mettent pas en évidence de telles dérégulations neurochimiques. A noter que, de manière concordante dans ces deux études, le turnover de la dopamine était diminué dans plusieurs régions du SNC, dont le striatum et le noyau Accumbens, et s'accompagnait d'une diminution de la locomotion chez les animaux exposés (Annexe 1, Tableau 2b).

Au plan des effets cognitifs, une étude portant sur des souris exposées aux PFD *in utero* (administration sous-cutanée, $200 \text{ mg}/\text{kg}$, tous les 3 jours depuis GD6 jusqu'à GD18) a montré des déficits dans le test de la piscine de Morris, mais pas 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).

Il est à noter que seules les études récentes ont pris en compte la possibilité d'un effet différentiel selon le sexe des animaux, les études plus anciennes n'ayant été conduites que sur les individus mâles. De ces travaux, il ressort que les souris mâles semblent être plus sensibles aux effets de l'exposition prénatale aux particules. En effet, les fœtus mâles exposés *in utero* conjointement aux PFD et à un stress maternel en fin de gestation, présentent à l'âge adulte des altérations cognitives plus marquées que les femelles (Bolton et al., 2013). Cette sensibilité accrue des mâles par rapport aux femelles aux effets d'une exposition précoce aux particules a été également rapportée par d'autres auteurs (Davis et al., 2013, Allen et al., 2014a). De la même manière, une

étude récente de Bolton et collaborateurs (2017) a montré que l'exposition prénatale aux PFD induit une augmentation de la production de cytokines et modifie la morphologie de la microglie des fœtus de souris mâles. Cette étude a également montré l'augmentation du volume cortical chez les fœtus mâles exposés, mais s'accompagne de sa diminution à l'âge adulte. Les raisons avancées de cette sensibilité différente entre mâles et femelles pourraient être liées à un neurodéveloppement différentiel des mâles et femelles en relation avec les hormones gonadiques. A titre d'exemple, Tsukue et collaborateurs (2009) ont montré que l'exposition périnatale au DE pendant la période périnatale (période critique de différenciation sexuelle du cerveau) peut avoir une incidence sur la fonction endocrinienne.

Ainsi, des perturbations neurodéveloppementales des descendants nés de mères exposées sont associées à des perturbations neurochimiques qui affectent différentes zones cérébrales.

2.2. Précautions à prendre dans l'examen des effets neurotoxiques issus de l'exposition gestationnelle aux particules

Les résultats obtenus dans les études expérimentales sont cependant variables et peuvent dépendre de la nature du polluant considéré et, dans le cas d'une exposition aux PFD, des caractéristiques exactes des gaz d'échappement produits par le moteur diesel utilisé. En outre, les conditions d'exposition (qui concernent la voie, les niveaux et la fréquence d'exposition), les modèles animaux utilisés, les fenêtres d'exposition et les perspectives de l'étude sont autant de facteurs de variation à prendre en considération.

2.2.1. Les conditions d'exposition rendent difficiles les comparaisons entre les données publiées

Les conditions d'exposition peuvent être qualifiées d' « invasives » ou « non-invasives ». Bien que peu représentatives des conditions rencontrées dans le cadre d'expositions environnementales, les conditions d'exposition dites « **invasives** » sont souvent utilisées puisqu'elles permettent d'étudier les mécanismes d'absorption et de dégradation des particules et/ou contrôler davantage les divers paramètres d'exposition (quantité de particules inhalées, par exemple). Ainsi, dans les modèles rongeurs, certaines nanoparticules manufacturées sont souvent administrées oralement par gavage (Hong et al., 2014a ; Hong et al. 2014b ; Yu et al., 2014) ou directement injectées par voie intraveineuse (Sumner et al., 2010), sous-cutanée (Ghaderi et al., 2015 ; Yokota et al., 2015) et intrapéritonéale (Di Bona et al., 2014), ou encore administrées par instillation intranasale ou intratrachéale, conditions qui permettent, en plus, de contrôler la quantité de particules atteignant directement les poumons (Kyjovska et al., 2015 ; Yoshizaki et al., 2015).

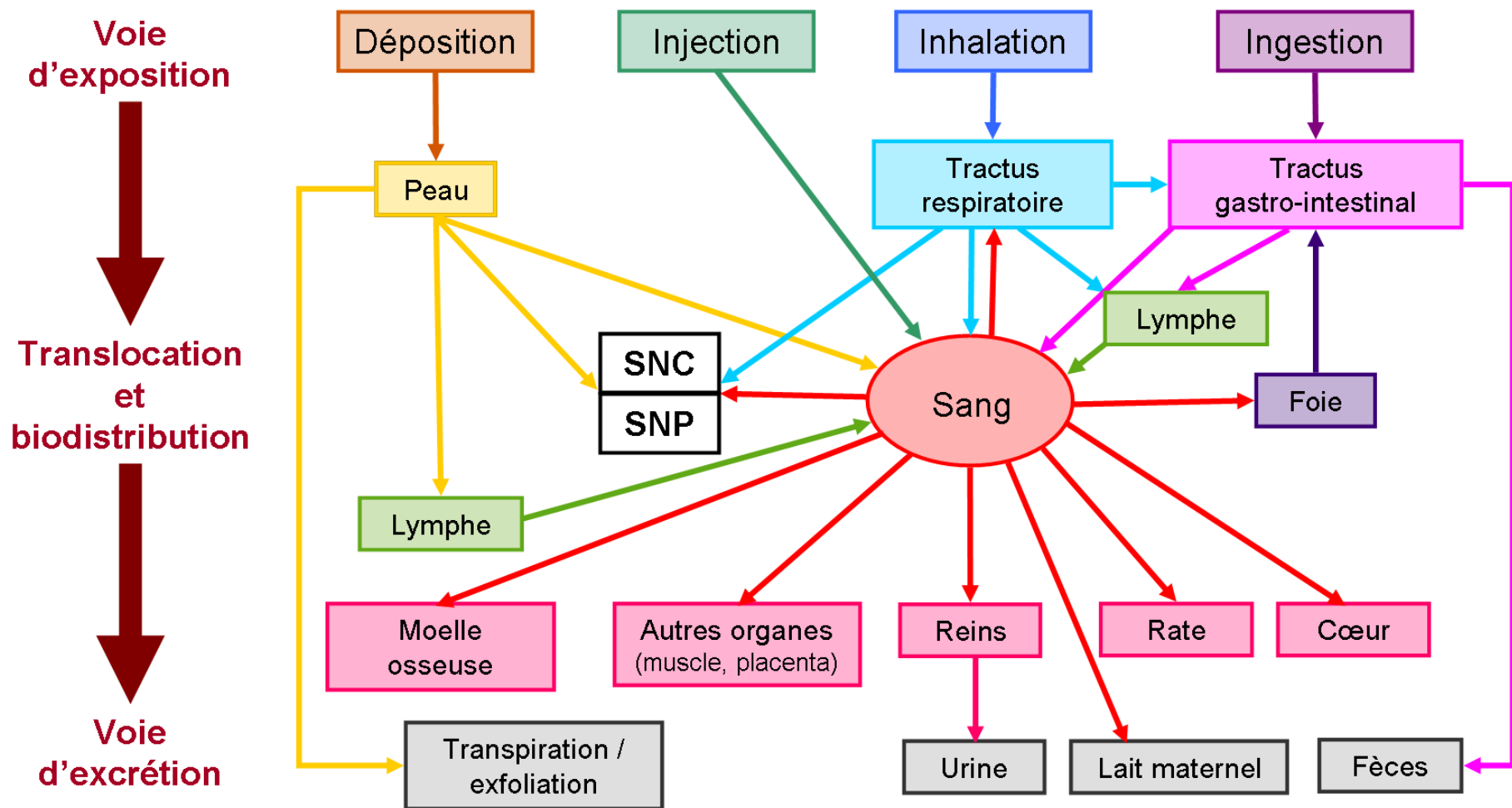


Figure A11 : Translocation de nanoparticules (NP) vers le système nerveux. Figure récapitulative des différentes voies d'exposition, les sites d'absorption, translocation et biodistribution, et des voies d'excrétion. A noter que les propriétés physico-chimiques des particules, et notamment leur propriétés de surface, sont déterminantes dans le comportement des particules, le taux et l'importance de la translocation par chacune des voies d'exposition présentées ici. Image inspirée de [Bencsik et al., 2018](#), [Oberdörster et al., 2005](#) et [Stone et al., 2017](#).

Dans les travaux à visée translationnelle, des conditions plus proches des conditions d'exposition chez l'homme (qu'on qualifiera ici de « **non-invasives** ») ont été recherchées dans des modèles d'exposition par inhalation, et développées principalement chez les rongeurs. Les animaux sont alors entièrement exposés à l'air pollué au sein de chambres d'exposition (Veras et al., 2008 ; Laskin et al., 2010 ; Campen et al., 2014), ce qui induit une contamination additionnelle à l'inhalation suite à l'ingestion d'éventuelles particules par le léchage du pelage. Les animaux peuvent également être exposés à l'air pollué par inhalation limitée à la voie nasale stricte grâce à un dispositif dit « nose-only », ce qui limite les conséquences liées à l'ingestion (dispositif utilisé dans notre étude ; Stinn et al., 2005 ; van Berlo et al., 2010).

Ces diverses conditions d'exposition traduisent des préoccupations quant à la capacité d'internalisation des particules, ainsi que leur capacité de translocation, accumulation et rétention dans les organes ou tissus cibles. En effet, différentes voies d'internalisation sont possibles et peuvent participer au potentiel toxique des nanoparticules (Figure A11). Différents travaux de recherche, dont ceux de Kreyling et collaborateurs (2013), se sont intéressés à la détermination quantitative d'accumulation de diverses nanoparticules dans divers tissus cibles en fonction des voies d'administration. Ainsi, sur la base de biocinétiques quantitatives après inhalation, instillation intratrachéale, injection intraveineuse ou gavage chez le rat, ils ont montré de petites fractions de NP (iridium, carbone, dioxyde de titane et or) dans différents organes, y compris le cerveau, le cœur et le squelette. Les fractions retrouvées étaient généralement inférieures à 0.1% de la dose administrée, mais dépendaient fortement de la taille des particules, des modifications apportées aux matériaux et à la surface, ainsi que de la voie d'administration (Bencsik et al., 2018 ; Buzea et al., 2007 ; Kreyling et al., 2013, 2016 ; Oberdörster et al., 2005).

Dans ces études, il est à noter que le taux de particules détectées dans le cerveau reste très bas, témoignant sans doute de l'efficacité des diverses barrières biologiques et, à l'occurrence, des systèmes de protection de l'encéphale.

2.2.2. Une attention particulière doit être portée au modèle animal utilisé lors de l'étude de l'exposition gestationnelle aux PFD

2.2.2.1. La maturation cérébrale diffère selon les espèces

Des spécificités liées à la physiologie du modèle animal sont aussi à prendre en compte pour permettre la transposition des effets d'une exposition gestationnelle aux particules de l'animal à l'homme : le SNC de chaque espèce présente de nombreuses spécificités en termes de vitesse de développement, de vulnérabilité et de systèmes de protection (pour revue Spear, 2004 ; Stewart & Kalueff, 2015 ; Semple et al., 2013). De plus, la plupart des études réalisées chez les rongeurs sont généralement supposées s'appliquer de manière égale à toutes les espèces et souches de rongeurs, ce qui peut ne pas être le cas (Wang et al., 2011). Il convient donc d'être prudent lors de

Tableau A2. Classification et description des différents types de placentation. Les espèces nous intéressant dans ce travail (à savoir, primates, lagomorphes et rongeurs) apparaissent en **gras**. Tableau repris de [Valentino et al., 2016b](#).

	Nom	Description	Espèce
Morphologie	Diffus	Recouvre la totalité de la surface de l'épithélium utérin	Suidé / Equidé / Cétacé
	Cotylédonaire	Distribution des villosités en cotylédons le long du sac chorionique allongé occupant le volume des cornes utérines	Ruminant
	Zonal	Présente un anneau équatorial ceinturant le sac chorionique où sont rassemblées les villosités placentaires	Carnivore
	Discoïde/Bidiscoïde	Caractérisé par un disque simple	Primate humain (1) / Rongeur
	Discoïde/Bidiscoïde	Caractérisé par un disque double	Primate non-humain / lagomorphe
Organisation	Plissé	Le chorion suit la forme plissée de l'épithélium utérin	Suidé
	Villeux	Constitué d'une colonne de trophoblaste (villosité primaire), puis d'un mésoderme qui s'infiltre (villosité secondaire) suivi d'une infiltration des vaisseaux fœtaux (villosité tertiaire)	Ruminant / Primate / Equidé
	Labyrinthique	La zone labyrinthique forme un réseau de villosités chorioniques fusionnées entourant les lacunes sanguines maternelles	Carnivore / Rongeur (2) / Lagomorphe
Histologie	Epithéliochorial	Pas d'invasion de l'épithélium utérin	Suidé / Equidé / Cétacé
	Synépithéliochorial	Type épithéliochorial avec un syncytium intercalé parmi les cellules épithéliales utérines	Ruminant
	Endothéliochorial	Syncytiotrophoblaste en contact direct avec l'endothélium des capillaires utérins sans invasion	Carnivore
	Hémochorial	<u>Hémodichorial</u> : Contact direct avec entre le chorion et la circulation maternelle ; une couche de syncytiotrophoblaste repose sur une couche de cytotrophoblaste	Primate / Lagomorphe
	Hémochorial	<u>Hémotrichorial</u> : Contact direct avec entre le chorion et la circulation maternelle ; une couche de cytotrophoblaste est apposée sur deux couches de syncytiotrophoblaste	Rongeur

1 : Chez l'homme, les villosités sont regroupées en amas, formant ainsi une vingtaine de pseudo-cotylédons ; **2** : Chez les rongeurs et les lagomorphes, il existe une zone jonctionnelle dite « spongiotrophoblaste » qui permet l'ancrage du placenta à la paroi utérine.

l'extrapolation d'études entre le rat et la souris et parmi différentes souches, car de telles comparaisons peuvent ne pas toujours être valables, comme évoqué par Yokota et collaborateurs (2015) lors de l'analyse des performances des souris ICR dans la piscine de Morris et la comparaison de leurs performances par rapport à celles des souris C56BL/6 utilisées par Vorhees et Williams (2006).

Bien que moins étudiés, il peut être avantageux de travailler avec des modèles animaux plus grands dans lesquels les structures cérébrales, y compris le contenu en matière blanche, reproduisent plus fidèlement la situation humaine et permettent des approches par imagerie facilitées. À cette fin, des moutons, des chats, des lapins ou encore des porcs ont été utilisés comme modèles de développement cérébral périnatal et postnatal (Duhaime, 2006 ; Finnie, 2012). Cependant, même si d'importants progrès ont été réalisés (Back et al., 2012 ; Drobyshevsky et al., 2012 ; Duhaime et al., 2000, 2003 ; Winter et 2011), les caractérisations biochimiques, anatomiques et comportementales dans ces modèles animaux sont limitées. En outre, l'émergence de paradigmes comportementaux adaptés aux espèces, visant à combler le fossé entre les études sur les grands animaux et les études chez l'homme, restent rares (Friess et al., 2007 ; Sullivan et al., 2013).

Dans le cadre de l'utilisation de ces mammifères modèles, un autre paramètre à prendre en compte est le développement cérébral, ce qui correspond, en général, à la capacité « d'autonomie » de l'animal à sa naissance. Ainsi, parmi les espèces chez lesquelles la croissance cérébrale se produit majoritairement avant la naissance (les espèces dites à développement cérébral « **prénatal** »), on peut citer les cobayes, les moutons et les singes. Ceux dont la croissance est la plus forte à la naissance (dites ainsi à développement cérébral « **périnatal** ») comprennent les humains et les porcs. Les espèces de poussée de croissance cérébrale « **postnatale** » comprennent les rats et les lapins (Duhaime, 2006 ; Finnie, 2012 ; Dobbing & Sands, 1979).

2.2.2.2. Les échanges fœto-placentaires dépendent de la structure

On sait également que des différences morphologiques et physiologiques, comme les différences anatomo-fonctionnelles placentaires nécessitent une attention particulière lors de l'évaluation des effets potentiels des particules sur le SNC en développement. En effet, le placenta est un organe complexe qui joue un rôle fondamental dans la reproduction et dans les échanges fœto-maternels. S'il est acquis que le placenta offre une protection efficace contre les risques environnementaux, il est important de prendre en compte les différences inter-espèces sur le plan des caractéristiques anatomiques et physiologiques afin de pouvoir transposer correctement les données relatives à la physiologie humaine et à la santé humaine pendant la grossesse.

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. Les types de placentation sont présentés sur

Encadré 5 : Le lapin, un modèle de reproduction pour la santé humaine

Le développement embryonnaire et fœto-placentaire du lapin, semblable à celui de l'humain, fait de ce dernier un modèle particulièrement adapté à l'étude de l'impact des facteurs environnementaux sur le développement de l'embryon et du fœtus et à terme sur la santé de la progéniture et de l'adulte.

Le premier critère s'appuie sur la **morphologie placentaire**. Chez l'Homme et la souris, le placenta est de type *discoïde* (disque simple), alors que le rat et le lapin présentent un placenta *bidiscoïde* (deux disques).

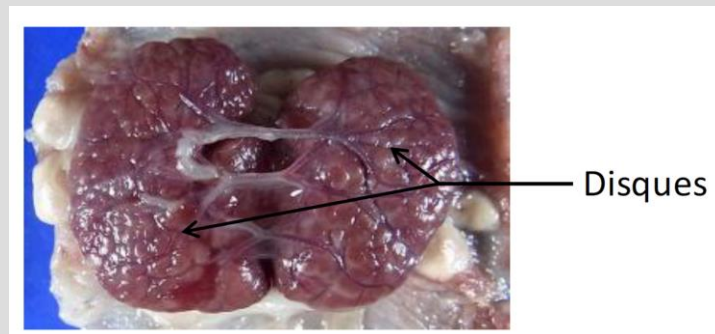
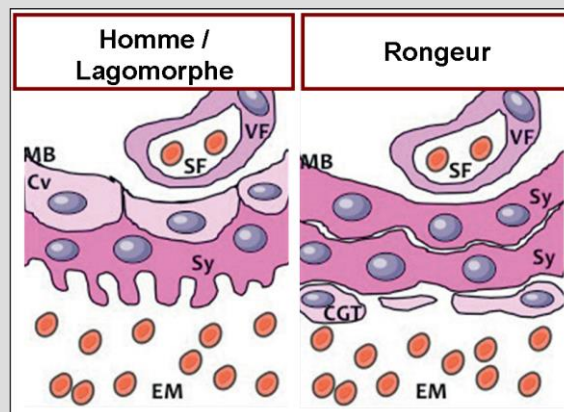


Photo d'un placenta de lapin à 28 jours de gestation (vu côté fœtal). Le placenta de lapin est bidiscoïde, labyrinthique et hémochorial. Image issue de [Valentino et al. 2016b](#).

Le deuxième critère s'appuie sur l'**histologie placentaire**. Les tissus endométriaux des primates, des lagomorphes et des rongeurs sont de type **hémochorial**, c'est-à-dire que le chorion est en contact direct avec le sang maternel. Chez l'homme et le lapin, le placenta est dit *hémodichorial*, (une couche de syncytiotrophoblaste repose sur une couche de cytotrophoblaste basal). Chez les rongeurs, une couche de cytotrophoblaste est apposée sur deux couches cellulaires de syncytiotrophoblaste basal, ce placenta est défini comme *hémotrichorial*.



Classification histologique des placentas hémochoriaux (hémodichorial, hémotrichorial). L'homme et le lapin possèdent un placenta de type hémodichorial, alors que les rongeurs ont un placenta de type hémotrichorial avec une couche de cellules géantes trophoblastiques directement en contact avec le sang maternel. **VF** : Vaisseau fœtal ; **SF** : Sang fœtal ; **MB** : Membrane basale ; **Sy** : Syncytiotrophoblaste ; **Cy** : Cytotrophoblaste ; **CGT** : Cellules géantes trophoblastiques ; **EM** : Espace sanguin maternel. Image issue de [Valentino et al. 2016c](#).

le tableau A2 et classés en fonction de la morphologie du placenta, de l'organisation de l'interface materno-fœtale et de la structure histologique de cette interface, en particulier du nombre de couches cellulaires présentes entre le sang maternel et fœtal ([Tarrade et al. 2014](#)) (Tableau A2 et Encadré 5). Le nombre de couches cellulaires séparant le trophoblaste du sang maternel varie selon qu'on s'adresse à une souris, un lapin, un ruminant ou une femme ([Chavatte-Palmer & Tarrade, 2016](#) ; [Valentino et al., 2016c](#) ; [Hougaard et al., 2015](#)). Comme c'est le cas chez l'Homme, plusieurs espèces animales comme les rongeurs ou les lagomorphes possèdent un placenta hémochorial, où le sang maternel est directement en contact avec le tissu trophoblastique fœtal ([Fischer et al., 2012](#) ; [Carter, 2007](#)). Si celui du rongeur est de type hémotrichorial (une couche de cytotrophoblaste sur deux couches de syncytiotrophoblaste), la structure hémochoriale (une couche de cytotrophoblaste sur une couche de syncytiotrophoblaste) du placenta du lapin est plus proche de celle de l'homme, ce qui pourrait faire de cet animal un modèle de choix pour la transposition à l'espèce humaine de questions ayant trait aux échanges fœto-placentaires (Encadré 5).

Cependant quelques différences morphologiques placentaires mettent l'homme plus proche de la souris ou font de l'homme une espèce unique : chez l'Homme et la souris, le placenta est de type discoïde (disque simple), alors que le rat et le lapin présentent un placenta bidiscoïde. Concernant l'architecture des membranes chorioniques (en contact avec le tissu utérin), chez l'Homme, il s'agit de villosités chorioniques, alors que chez les rongeurs et les lapins, le placenta est de type labyrinthique, c'est-à-dire que les villosités chorioniques fusionnées entourant les lacunes sanguines maternelles.

L'ensemble des notions exposées ici indique que le choix du modèle animal est prépondérant dans les études toxicologiques, et conditionnera les fenêtres d'exposition et d'observation visées et, ainsi, les conclusions qui peuvent être tirées des travaux expérimentaux.

Partie III – Le continuum anatomo-fonctionnel entre le système olfactif et le cerveau : le lien entre environnement et SNC

<u>1</u>	Les particules inhalées peuvent atteindre directement le cerveau par voie systémique et olfactive	31
<u>2</u>	Les dysfonctionnements olfactifs pourraient être considérés comme indicateurs précoces de neuropathologies dans des régions plus centrales	43

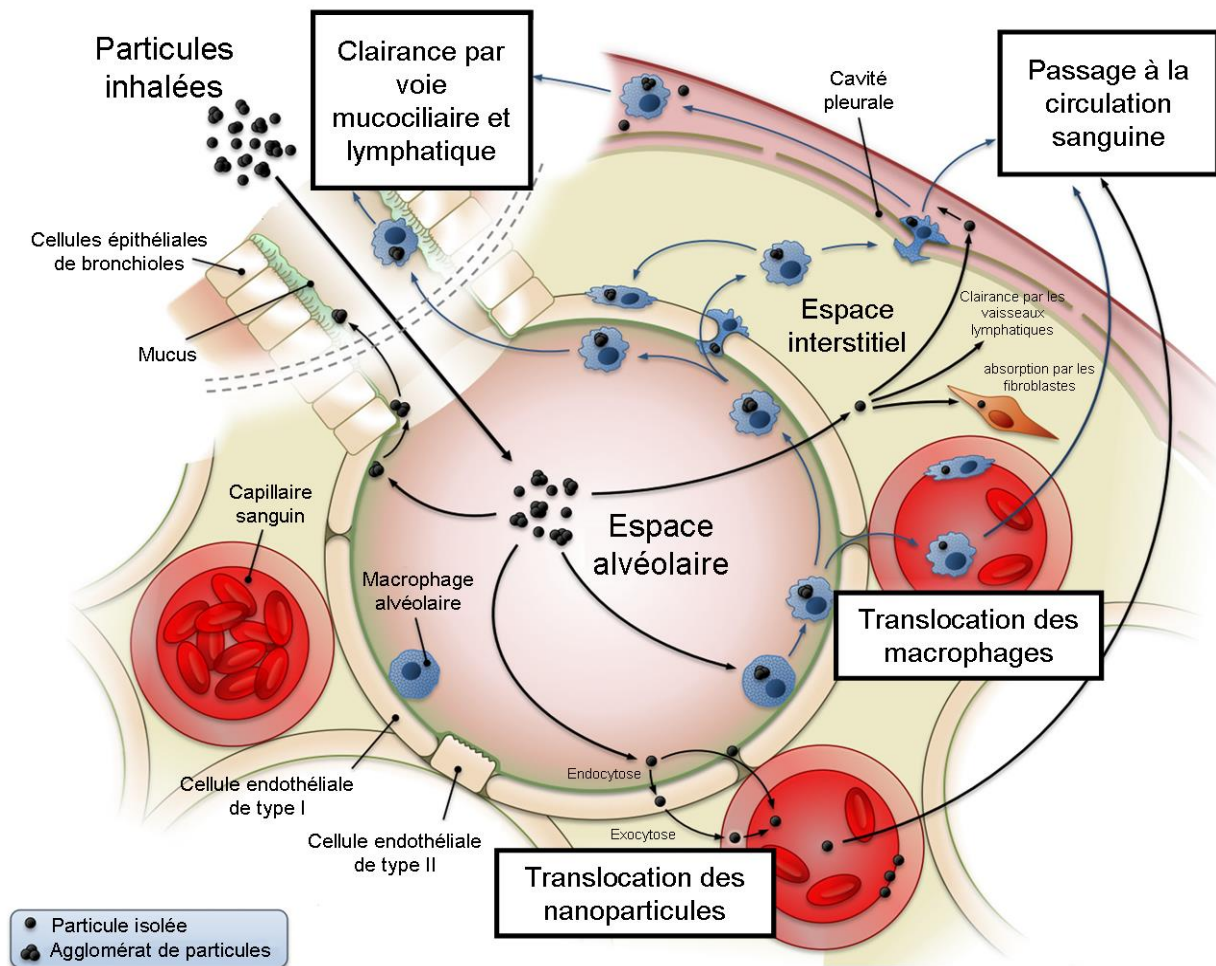


Figure A12 : Translocation de nanoparticules (NP) inhalées dans la circulation sanguine. L'exposition aux nanoparticules par les poumons peut entraîner une translocation de ces dernières dans l'épithélium et les espaces interstitiels. Une autre voie possible de translocation peut résulter d'une endocytose par les cellules épithéliales (types I et II), ou encore d'une phagocytose par les macrophages alvéolaires. Ces NP peuvent ainsi passer à travers la membrane vasculaire endothéliale et atteindre la circulation sanguine ainsi que le système de drainage lymphatique. Il est à noter qu'une grande partie de ces particules semble être éliminée par voie mucociliaire et lymphatique, via l'activation macrophagique, témoignant ainsi de l'efficacité de « nettoyage » du système immunitaire ; cependant, ce phénomène s'accompagne toujours d'une réaction inflammatoire plus ou moins importante. Image issue de [Stone et al., 2017](#).

1. Les particules inhalées peuvent atteindre le cerveau par voie systémique et olfactive

Alors que l'exposition à la pollution atmosphérique pourrait participer à l'émergence de troubles neurodéveloppementaux et neurodégénératifs, la question est de savoir si les particules atteignent le cerveau, et si oui, quelles sont la ou les voies qu'elles utilisent pour l'atteindre.

Une fois inhalées, les particules peuvent se déposer dans les voies respiratoires supérieures (Figure A12) ; une grande partie de ces particules est éliminée par voie mucociliaire, y compris au niveau de la cavité nasale ([Heusinkveld et al., 2016](#)). Toutefois, ce système fonctionne beaucoup moins bien pour les petites particules (PM_{2.5}) et est très inefficace pour les particules ultrafines qui peuvent donc pénétrer sans encombre au sein des alvéoles pulmonaires. La tâche de « nettoyage » est alors sous contrôle du système immunitaire, notamment les macrophages résidant principalement dans la région alvéolaire. Celui-ci peut réagir rapidement, mais doit désassembler les particules de poussière et les transporter via la circulation. Ce phénomène s'accompagne donc toujours d'une réaction inflammatoire plus ou moins importante (Figure A12).

Une fraction de ces particules inhalées peut se déplacer à travers les barrières épithéliales qu'elles soient pulmonaires, gastro-intestinales ou dermiques (Figure A11) pour gagner la circulation sanguine et franchir la barrière hémato-encéphalique vers le parenchyme cérébral (on parlera ici de **voie systémique**) ([Bencsik et al., 2018](#) ; [Kreyling, 2013, 2016](#) ; [Oberdorster et al., 2005, 2009](#)).

Outre la *voie systémique*, une voie additionnelle pour atteindre le SNC est la voie olfactive qui implique les neurones sensoriels olfactifs, en contact direct avec l'environnement et le cerveau *via* le bulbe olfactif (BO), ainsi que le nerf trijumeau dont les terminaisons nerveuses innervent les muqueuses olfactive et respiratoire, et dont une partie rejoint des régions cérébrales rostrales (et, parmi elles, le BO) et caudales (on parlera dans ce cas de **voie olfactive**) ([Bencsik et al., 2018](#) ; [Dhuria et al., 2010](#) ; [Ibanez et al., 2014](#) ; [Kinoshita et al., 2008](#) ; [Schaefer et al., 2002](#)) (Figure A13).

Cette voie peut permettre ainsi une translocation directe des nanoparticules vers le cerveau en évitant de devoir traverser la barrière hémato-encéphalique ([Crawford et al., 2016](#) ; [Elder et al., 2006](#) ; [Lewis et al., 2005](#) ; [Santander-Ortega et al., 2017](#)). L'existence de cette voie et la possibilité que d'autres nerfs et structures sensorielles de la cavité nasale puissent être impliqués dans le transport direct des particules vers le cerveau, suggère que les régions cérébrales cibles de ces particules peuvent être nombreuses. De plus, il est possible que les vaisseaux lymphatiques nasaux puissent rejoindre les ventricules cérébraux, l'espace sous-arachnoïdien et le liquide céphalo-

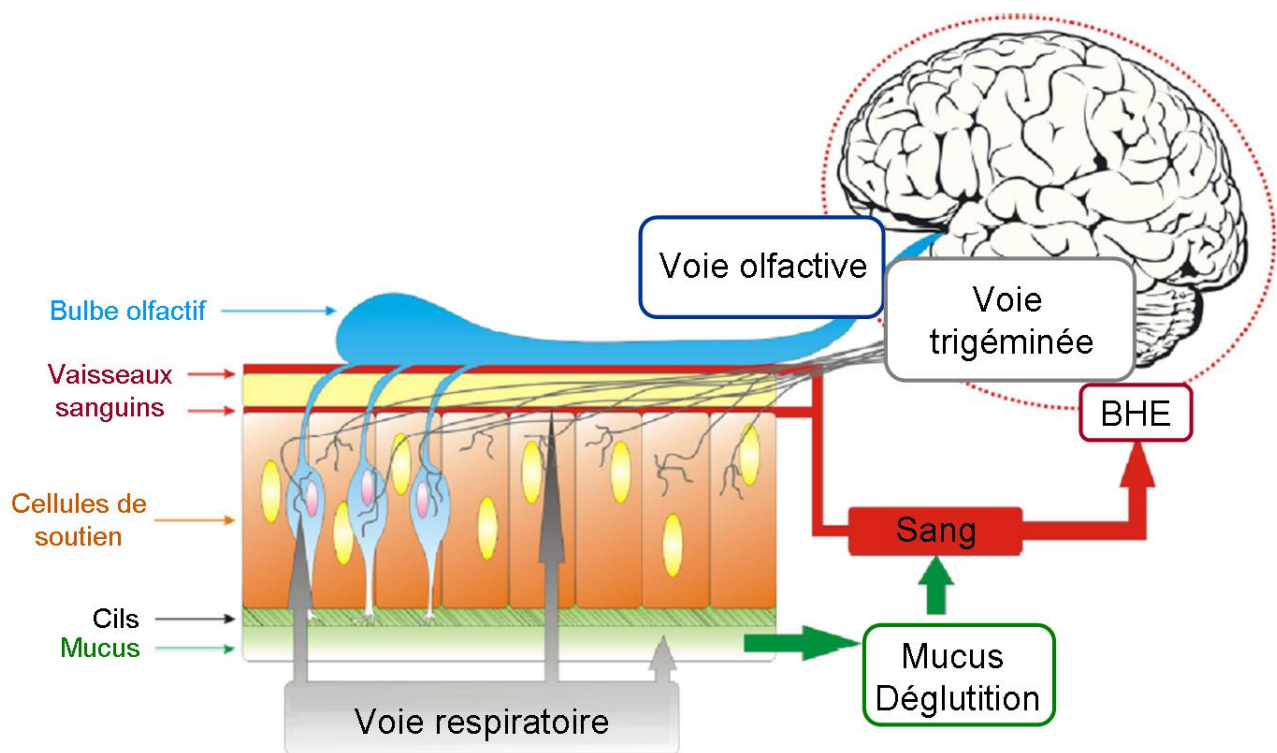


Figure A13 : Translocation de nanoparticules (NP) vers le système nerveux via la voie olfactive. L'exposition aux nanoparticules par voie nasale peut entraîner une translocation de ces dernières dans l'épithélium olfactif et les espaces interstitiels. La translocation des NP peut également résulter d'une endocytose par les cils des neurones sensoriels olfactifs, ou encore via les terminaisons nerveuses du nerf trijumeau. Ces NP peuvent ainsi atteindre directement diverses régions du SNC ou alors atteindre la circulation sanguine, puis le SNC. Il est à noter que les taux de particules détectées dans le cerveau restent très bas, témoignant de l'efficacité des systèmes de protection de l'encéphale. Image issue de [Santander-Ortega et al., 2017](#).

rachidien (LCR), ce qui pourrait entraîner une accumulation supplémentaire des particules dans diverses régions du cerveau ([Santander-Ortega et al., 2017](#)).

Il est utile de rappeler ici que les propriétés physico-chimiques des particules, et notamment leurs propriétés de surface, sont déterminantes au plan de leur comportement et de l'importance du niveau de translocation par chacune des voies d'exposition ([Crawford et al., 2016](#) ; [Pardeshi, & Belgamwar, 2013](#) ; [Santander-Ortega et al., 2017](#)).

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, soit à un **effet indirect** lié, par exemple, à des processus d'inflammation induits par la présence des particules pouvant ainsi contribuer à une atteinte neuronale et/ou tissulaire. L'impact respectif de ces modes d'action (voie directe par rapport à voie indirecte) semble dépendre des niveaux d'exposition et des sites de dépôt des particules, de leur réactivité intrinsèque (par exemple, l'inflammation ou le stress oxydatif), ou encore de la physiologie et la susceptibilité de l'individu ([Heusinkveld et al., 2016](#)).

Nous décrivons, par la suite, deux voies principales de transfert des particules vers le système nerveux central : la voie systémique, restreinte à la barrière hémato-encéphalique et la voie olfactive, limitée uniquement au système olfactif.

1.1. Transfert particulaire vers le SNC via la BHE

1.1.1. La voie systémique liée à la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) constitue une barrière biologique de protection étroite qui sépare la circulation sanguine dans le cerveau de la circulation systémique grâce à la présence de 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](#)). Ainsi, par rapport à d'autres barrières biologiques, la BHE est particulièrement étanche, ce qui réduit considérablement le risque d'exposition à des menaces systémiques telles que les produits chimiques et les agents pathogènes. Malgré son étanchéité, il a été démontré que les particules véhiculées par le sang peuvent migrer au travers de la BHE, et que l'exposition à certaines particules peut augmenter la perméabilité de cette dernière ([Sharma et al., 2009](#)) (Figure A14). En particulier, l'un des paramètres pouvant déclencher le mouvement d'une particule vers le parenchyme cérébral est son potentiel de surface, qui va lui conférer des propriétés physico-chimiques particulières, favorisant la formation d'une couronne de protéine autour de la particule au contact des fluides biologiques. Cette modification entraîne sa captation rapide par le système phagocytaire et semble influencer son passage à travers les barrières biologiques et son interaction avec les

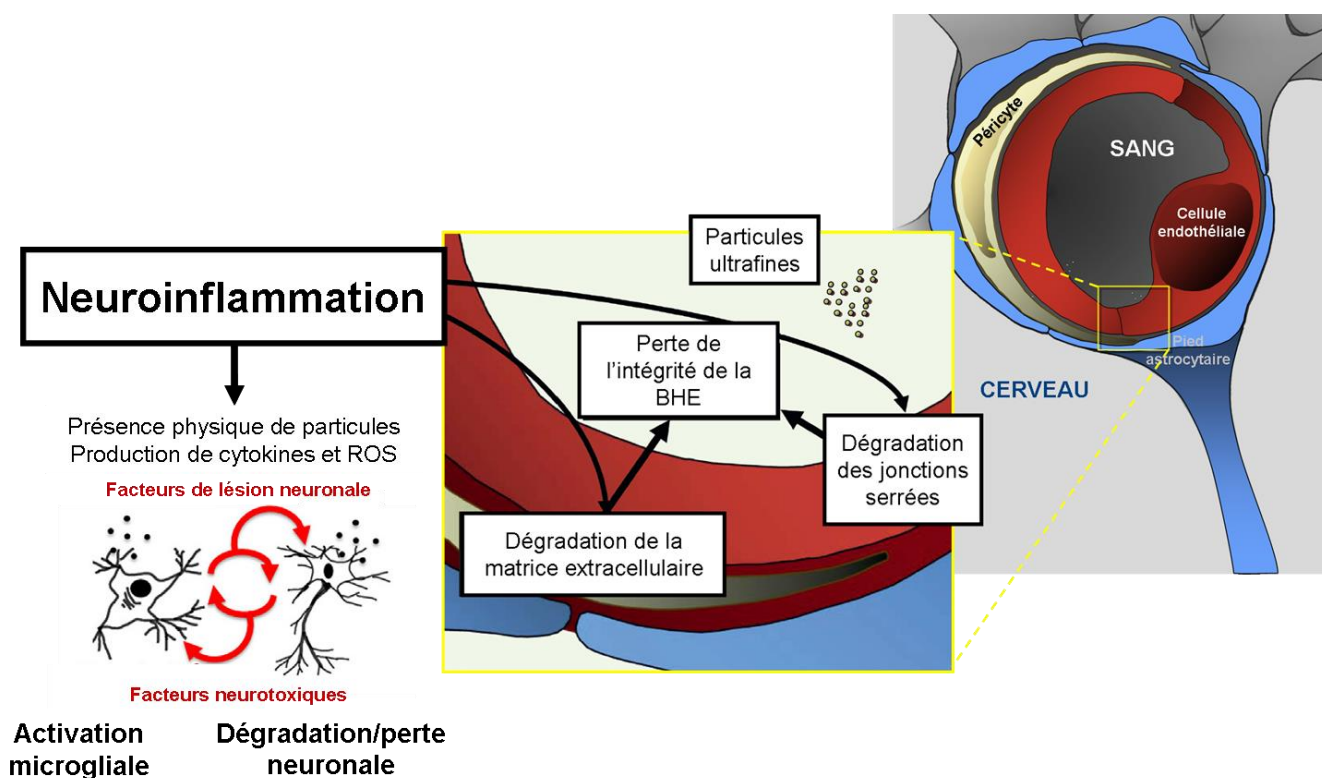


Figure A14 : Aperçu des principaux effets de la présence des particules dans la circulation sanguine sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. Les particules véhiculées par le sang peuvent augmenter la perméabilité de la BHE, migrer au travers de cette dernière et ainsi atteindre directement le cerveau. Les particules dans le sang peuvent également conduire à une inflammation systémique et déclencher l'activation des cellules gliales (menant à la production de cytokines et ROS) et provoquer ainsi une inflammation et un stress oxydatif au niveau cérébral. Ces actions mènent à une activation microgliale et, potentiellement, à une perte neuronale, ce qui augmente le risque de troubles neurodéveloppementaux et neurodégénératifs. Adapté de D'Angiulli et al., 2018 et Gosselet et al., 2011.

différents tissus (Albanese et al., 2012 ; Ali et al., 2015; Docter et al., 2015 ; Duan et Li, 2012 ; Ruiz et al., 2015). Outre la couronne protéique qui se forme au contact des fluides biologiques, les particules en suspension dans l'air telles que les PFD peuvent également servir de support pour d'autres composants organiques toxiques tels que les HAP (Omidvarborna et al., 2015).

Ainsi, le transport des particules à travers la BHE peut constituer une menace pour le cerveau, ces dernières subissant des modifications de leur surface et agissant comme vecteurs de composants toxiques dans le parenchyme cérébral et pouvant déclencher l'activation des cellules gliales et provoquer ainsi une inflammation et un stress oxydatif (Sharma et al., 2009) (Figure A14).

1.1.2 La réponse immunitaire périphérique liée aux particules endommage la BHE et peut altérer le fonctionnement neuronal

Sur le plan mécanistique, des effets délétères de la présence de particules au niveau des cellules endothéliales dans le système vasculaire cérébral ont été rapportés (Calderón-Garcidueñas et al., 2008a, 2014). Des études *in vitro* utilisant des capillaires cérébraux entiers de rats exposés ont ainsi montré que l'exposition aux particules mène à la production de cytokines et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) (Hartz et al., 2008). 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 microgiale (Block et Hong, 2005).

Il est à noter que les réponses inflammatoires des organes autres que le cerveau peut induire indirectement des altérations du SNC *via* la voie microgiale, suggérant ainsi que la présence physique des particules dans le cerveau n'est pas nécessaire pour induire des altérations neuronales. Dans ce cas, une inflammation périphérique entraîne la libération de signaux pro-inflammatoires (cytokines, par exemple) dans la circulation systémique qui activent à leur tour la microglie cérébrale et modifient le fonctionnement neuronal (Block et al., 2012). Pour autant, le rôle de la réponse immunitaire périphérique dans les effets de la pollution de l'air sur le SNC reste peu étudié à ce jour

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, il reste aussi à déterminer si la réponse inflammatoire maternelle peut influencer le développement fœtal (Encadré 3 et Figure A14), et si oui à en caractériser les mécanismes.

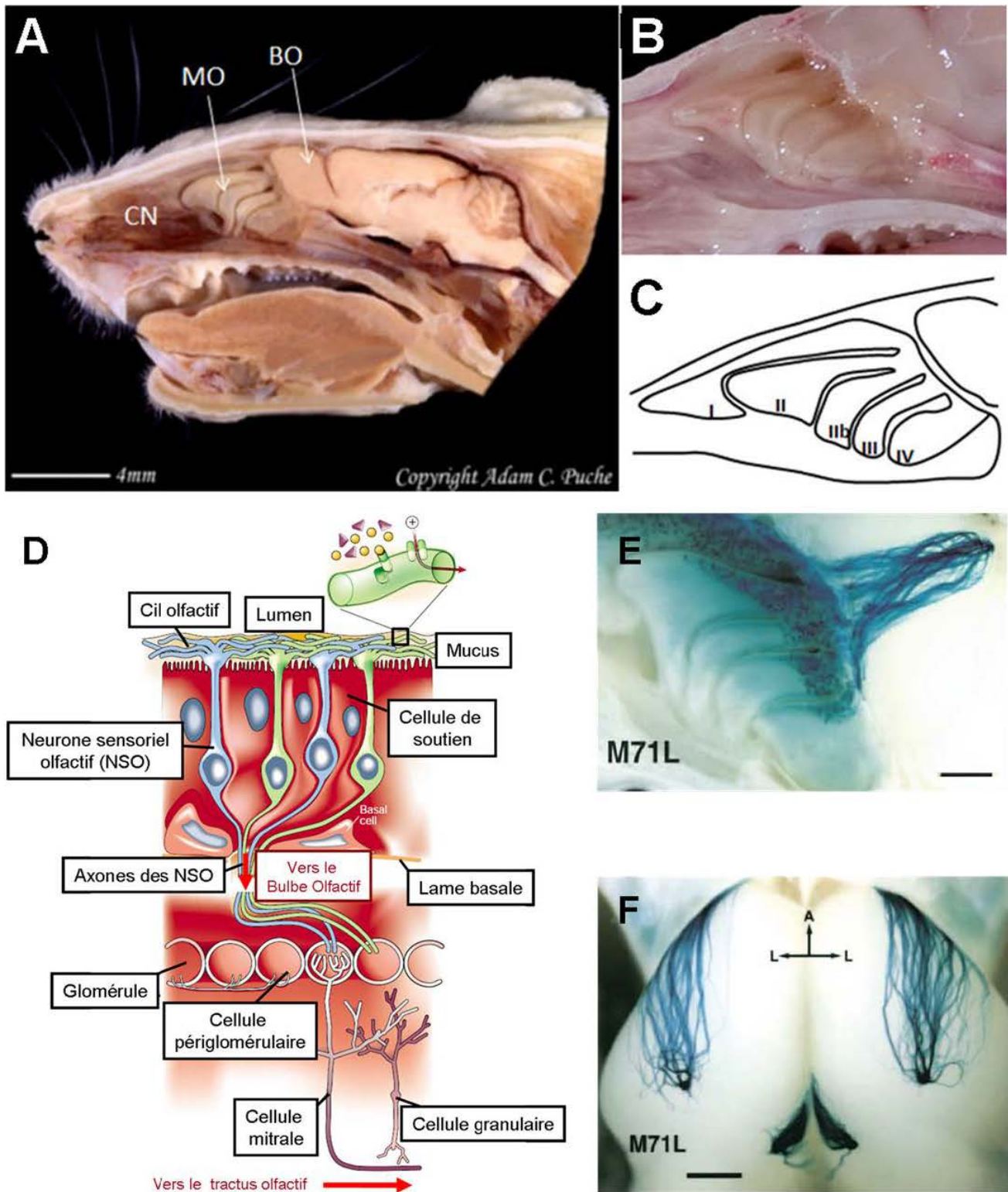


Figure 15 : Connectivité entre l'épithélium et le bulbe olfactif. A-C : Système olfactif principal. A. Photo d'une hémisphère de rat en coupe sagittale mettant en évidence les deux tissus du système olfactif principal : muqueuse olfactive (MO) au fond de la cavité nasale (CN) et bulbe olfactif (BO) à l'arrière de la muqueuse. **B et C.** Photo de la muqueuse olfactive de rat en coupe sagittale et schéma représentatif de son organisation, respectivement. **D-F : Projections axonales des neurones sensoriels olfactifs (NSO) exprimant le même récepteur olfactif (RO).** **D.** Schéma d'organisation des NSO dans la muqueuse olfactive (MO) et de leurs projections axonales au niveau des glomérules du bulbe olfactif (BO). Adapté de Feinstein, 2001. **E.** Bloc entier contenant la MO et BO d'une souris avec des NSO co-exprimant le RO M71 et le marqueur lacZ (colorés en bleu). Les axones d'un même type de NSO, exprimant tous le même récepteur olfactif, convergent au sein d'un même glomérule. **F.** Vue du dessus des glomérules formés par les axones des NSO exprimant M71. Barres d'échelle : D et E : 500µm. Adapté de Feinstein et Mombaerts, 2004.

1.2. Transfert particulaire vers le SNC via le système olfactif

1.2.1. Le système olfactif

Afin de mieux comprendre les voies de la perception olfactive et leur rôle possible dans le transfert particulaire, il convient de passer en revue brièvement les propriétés anatomo-fonctionnelle du continuum entre le système olfactif et les parties plus centrales du cerveau. En raison de la complexité du système olfactif, on se concentrera sur le système olfactif principal, que l'on décrira d'abord au plan de son anatomie avant d'aborder son fonctionnement.

1.2.1.1. Les neurones sensoriels olfactifs : siège de la transduction du stimulus olfactif

La muqueuse olfactive (MO) tapisse la partie antérieure et dorsale des cavités nasales en recouvrant des extensions de l'os éthmoïde qui forme des circonvolutions ou cornets (Figure A15 A-C), ces circonvolutions permettant d'augmenter la surface d'interaction entre l'épithélium et l'environnement, et de canaliser l'air. Ainsi, l'air chargé d'odorants passe d'abord dans la partie centrale et dorsale des circonvolutions, sous la forme d'un flux présentant des turbulences puis dans les parties latérales et ventrales, sous la forme d'un flux laminaire, avant de sortir de la cavité nasale (Kimbell et coll., 1997). La MO est recouverte d'un mucus produit par des glandes spécifiques (les glandes de Bowman) présentes dans la cavité nasale ; ce mucus va ainsi « piéger » et solubiliser les odeurs arrivant dans le flux d'air (Encadré 6).

La MO est constituée de trois types cellulaires (les cellules de soutien, les neurones sensoriels olfactifs et les cellules basales). Les **neurones sensoriels olfactifs (NSO)** sont responsables de la transduction de l'information olfactive suite à la liaison d'un odorant à leur surface (Encadré 6 et Figure A15D). Chez le rongeur, on en dénombre plusieurs millions qui couvrent l'ensemble de la muqueuse olfactive (Meisami, 1989). Ces neurones bipolaires traversent la totalité de la MO, avec un bouton dendritique pourvu de nombreux cils olfactifs baignant dans le mucus et un axone non-myélinisé qui achemine l'influx nerveux vers le **système nerveux central**. Les cils portent des récepteurs capables de lier les molécules odorantes : les récepteurs olfactifs (ROs). Ces derniers sont des protéines membranaires à sept segments transmembranaires associées aux protéines G, en l'occurrence la protéine G_{olf} couplée à des canaux voltage-dépendants assurant la transduction du signal olfactif. Chaque neurone sensoriel exprime majoritairement *un seul allèle* d'un des centaines de gènes de récepteurs olfactifs (Buck & Axel, 1991 ; Ressler et al., 1993 ; Serizawa et al., 2003 ; Vassar et al., 1993). Cette découverte de la famille de gènes codant pour ces protéines a valu le prix Nobel à ses auteurs, Linda Buck et Richard Axel (Buck & Axel, 1991). Le type de RO exprimé par le neurone sensoriel olfactif déterminera sa sensibilité aux odeurs, ainsi que les connexions axonales qu'il établira avec les autres neurones du système olfactif (Monahan & Lomvardas, 2015).

Encadré 6 : La Muqueuse Olfactive (MO)

La **muqueuse olfactive (MO)** est composée d'un neuroépithélium sensoriel qui tapisse le fond des cavités nasales reposant sur une lame basale, et d'une *sous-muqueuse de tissu conjonctif*. Il est en continuité directe avec la muqueuse respiratoire, située en avant de la cavité nasale.

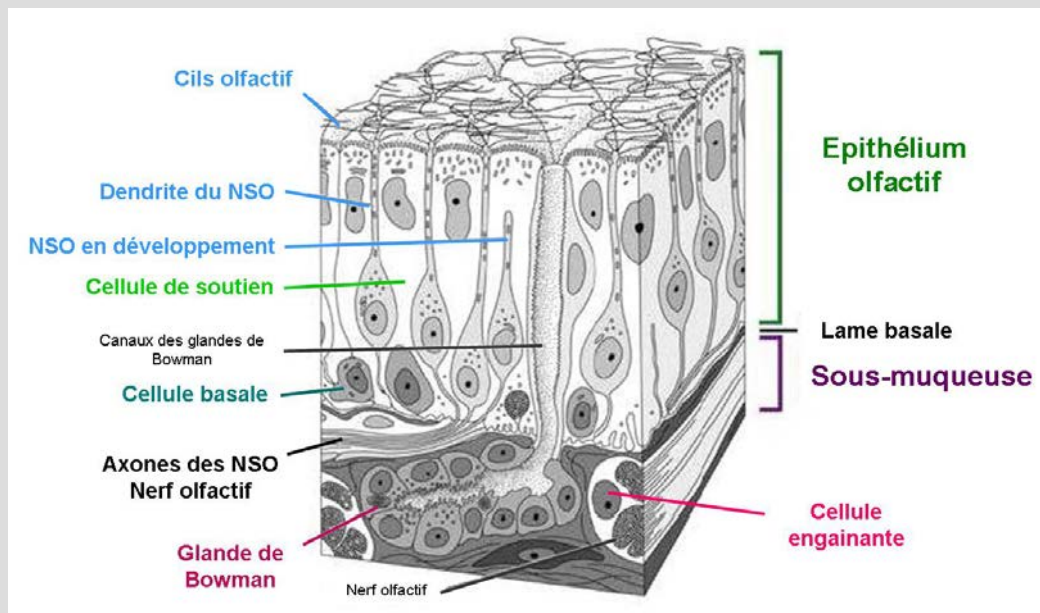
L'**épithélium olfactif**, est composé de quatre types cellulaires : Les glandes de Bowman, les cellules de soutien, les neurones sensoriels olfactifs (NSO) et les cellules basales ([Schwob, 2002](#)).

Les **glandes de Bowman**, glandes exocrines acineuses séreuses, sont responsables de la production et sécrétion du mucus, et participent à la protection et à la détoxification de l'épithélium olfactif.

Les **cellules de soutien** sont des cellules pourvues de microvillosités qui participent au maintien de l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'épithélium olfactif.

Les **neurones sensoriels olfactifs (NSO)** sont les neurones bipolaires responsables de la transduction du message chimique en signal électrique.

Les **cellules basales**, à la base de l'épithélium olfactif, sont une population de cellules souches qui se différencient pour donner naissance à de *nouvelles cellules* de soutien ou neuronales ([Graziadei and Graziadei, 1979](#)).



Cyto-architecture de la muqueuse olfactive. Image adaptée de *histologie humaine*, [Stevens & Lowe, 2005](#).

Les neurones sensoriels olfactifs (NSO) assurent ainsi les fonctions de réception des stimuli, de transduction du signal chimique en signal électrique, et de transmission centripète de l'information sensorielle olfactive (pour revues, voir [Schild & Restrepo, 1998](#) ; [Buck, 2000](#)).

Il est important de remarquer que les NSO sont les seuls neurones de l'organisme en contact direct avec l'environnement, ce qui les expose également aux agents pathogènes en suspension dans l'air ([Schwob, 2002](#), [Doty, 2012b](#)). Face à ces agressions, l'intégrité du tissu épithélial est maintenue par des systèmes de protection et de détoxification performants, mais également par un renouvellement continu des cellules olfactives, dont la durée de vie varie entre 30 et 120 jours ([Crews & Hunter, 1994](#)). Au sein de l'épithélium cohabitent ainsi des neurones matures et immatures.

1.2.1.2. Connectivité entre l'épithélium et le bulbe olfactif

Dès leur passage à travers de la lame basale, les axones des NSO se regroupent en faisceaux entourés de cellules gliales engainantes, traversent la lame criblée de l'ethmoïde au fond de la cavité nasale et contactent le **bulbe olfactif (BO)** (Encadré 7), premier relais du SNC qui est responsable du **décodage** et de **l'intégration de l'information olfactive** ([Cleland & Linster, 2005](#)) avant l'envoi au cortex ([Kay & Sherman, 2007](#)). Le contact entre la MO et le BO s'établit *via* des structures sphéroïdes appelées **glomérules**. Tous les neurones sensoriels exprimant un même récepteur olfactif voient leur axone converger vers un nombre réduit de glomérules ([Ressler et al., 1994](#) ; [Vassar et al., 1994](#)), comme on peut le voir sur la Figure A15 (E-F), pour le récepteur M71 murin couplé à Lac Z. Il existe donc une représentation topographique des récepteurs olfactifs à la surface du BO.

Cette représentation est symétrique entre les deux héli-bulbes ; en effet, le récepteur olfactif exprimé à la surface des cils des NSO est également présent dans l'axone, où il permet son adressage dans le glomérule approprié ([Wang et al., 1998](#)). Cette « identité » conférée au glomérule *via* la convergence des axones des NSO iso-réceptifs induit la formation de connexions appropriées dans le circuit neuronal bulbaire ([Belluscio et al., 2002](#) ; [Lodovichi et al., 2003](#)).

Les axones des NSO forment une architecture précise de projections entre l'épithélium et le BO, en fonction des caractéristiques physico-chimiques (odotopes) des molécules odorantes auxquelles ils sont sensibles, suggérant une « carte d'activité » glomérulaire. De plus, des glomérules répondant à des odotopes identiques ou similaires sont le plus souvent voisins, suggérant que des interactions de voisinage sont pertinentes et ont lieu entre les glomérules ou dans le réseau neuronal sous-jacent ([Mori et al., 2006](#)). Ces observations ont apporté les bases de la théorie d'un codage spatial dans le système olfactif ([Mombaerts et al., 1996, 2006](#) ; [Ressler et al., 1994](#) ; [Vassar et al., 1994](#) ; [Zou et al., 2009](#)).

Encadré 7 : Le Bulbe Olfactif (BO)

Le **bulbe olfactif (BO)**, situé à la base du cerveau directement au-dessus de la *lame criblée*, présente une organisation en couches concentriques, définies anatomiquement sur la base du type et de la composition cellulaire (en excluant les cellules gliales, non décrites ici). De *l'extérieur vers l'intérieur*, on trouve :

La couche des **arrivées axonales (ONL)**, constituée des faisceaux d'axones non myélinisés des NSO issus de l'épithélium olfactif ([Shepherd, 1972](#) ; [Whitman & Greer, 2009](#)).

La couche **glomérulaire (GL)**, constituée de structures sphériques, les glomérules.

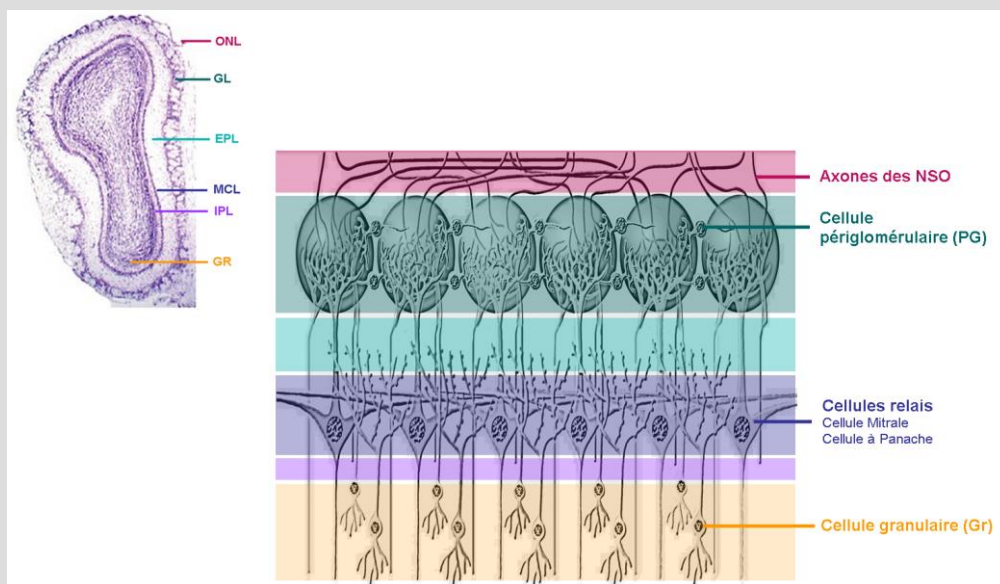
Les **glomérules** sont les zones de contacts synaptiques entre les axones des NSO, les dendrites des **cellules relais** du BO, ainsi que les dendrites des cellules **périglomérulaires (PG)** ([Pinching & Powell, 1971](#)), interneurones délimitant la structure sphérique du glomérule ([Pinching & Powell, 1971](#) ; [Shepherd, 1972](#)).

La couche **plexiforme externe (EPL)**, composée essentiellement des dendrites des *cellules relais*, qui contactent les *glomérules* ([Price and Powell, 1970](#) ; [Mori et al., 1983](#)), et des dendrites des cellules granulaires, ainsi que par les terminaisons axonales de **fibres centrifuges** ([Pinching and Powell, 1971](#)).

La **couche des cellules relais (MCL)**, qui comprend deux types cellulaires : les cellules mitrales et les cellules à panache.

La couche **plexiforme interne (IPL)**, traversée par les axones des cellules relais, par les axones et les ramifications axonales de fibres centrifuges, ainsi que par les dendrites des cellules granulaires ([Shepherd, 1972](#)).

La couche **granulaire (GR)**, composée de grappes de corps cellulaires d'une autre catégorie d'interneurones : les **cellules granulaires (Gr)**.



Cyto-architecture du bulbe olfactif. Inspiré de [Mori et al., 1983](#).

1.2.2. Synaptologie du système olfactif

L'information olfactive issue de la périphérie est modulée principalement à deux niveaux du BO, qui est constitué de différentes couches cellulaires concentriques fonctionnelles (Encadré 7). D'une part, à l'entrée, au sein du glomérule, par les nombreuses interactions entre les différents types cellulaires ; d'autre part, au niveau de la couche granulaire, par les interactions entre les dendrites des cellules relais et les dendrites des interneurons granulaires.

1.2.2.1. Synaptologie Glomérulaire

Chaque glomérule reçoit plusieurs milliers d'axones de *NSO*, formant des synapses **excitatrices** glutamatergiques sur les dendrites des cellules mitrales et à panache (dites *cellules relais*), ainsi que sur les dendrites de certaines *cellules périglomérulaires (PG)* (Pinching & Powell, 1971 ; Ennis et al., 1996 ; Wachowiak & Shipley, 2006). Une carte spatiale d'activation glomérulaire précise, stéréotypée et sollicitant différents glomérules est alors créée dans le BO selon un ratio de **convergence** d'environ 20.000 *NSO* pour une cellule mitrale (Figure A16).

Les contacts axo-dendritiques qui s'établissent au sein des *glomérules* ont été largement décrits en microscopie électronique à transmission par Pinching et Powell dans les années 70 (Pinching & Powell, 1971). Les *cellules relais* reçoivent des contacts monosynaptiques des axones des *NSO* (Figure A16) (Mori et al., 1999 ; Wachowiak & Shipley, 2006). Les dendrites des cellules relais forment des synapses **excitatrices** glutamatergiques avec les dendrites des *PG* ; les *PG* forment, en retour, des synapses **inhibitrices** GABAergiques sur les dendrites des *cellules relais* (Mori et al., 1999 ; Wachowiak & Shipley, 2006). Les *PG* forment également des synapses GABAergiques et dopaminergiques **inhibitrices** sur les terminaisons axonales des *NSO* (Ennis et al., 2001 ; Mori et al., 1999 ; Wachowiak & Shipley, 2006).

Les *PG* sont donc capables de **limiter** la quantité d'information olfactive entrant dans le *glomérule*, mais également de **modérer** la réponse des *neurones relais* à cette information.

Etant donné que les *cellules relais* reçoivent des afférences monosynaptiques des *NSO* et contactent les *PG* par des synapses glutamatergiques excitatrices, elles favorisent l'activité inhibitrice de ces dernières dans les glomérules voisins. Les cellules mitrales et à panache sont impliquées dans des phénomènes d'**inhibition latérale** et restreignent l'étendue spatiale de l'activation glomérulaire en réponse aux odeurs (Mori et al., 1999 ; Wachowiak & Shipley, 2006).

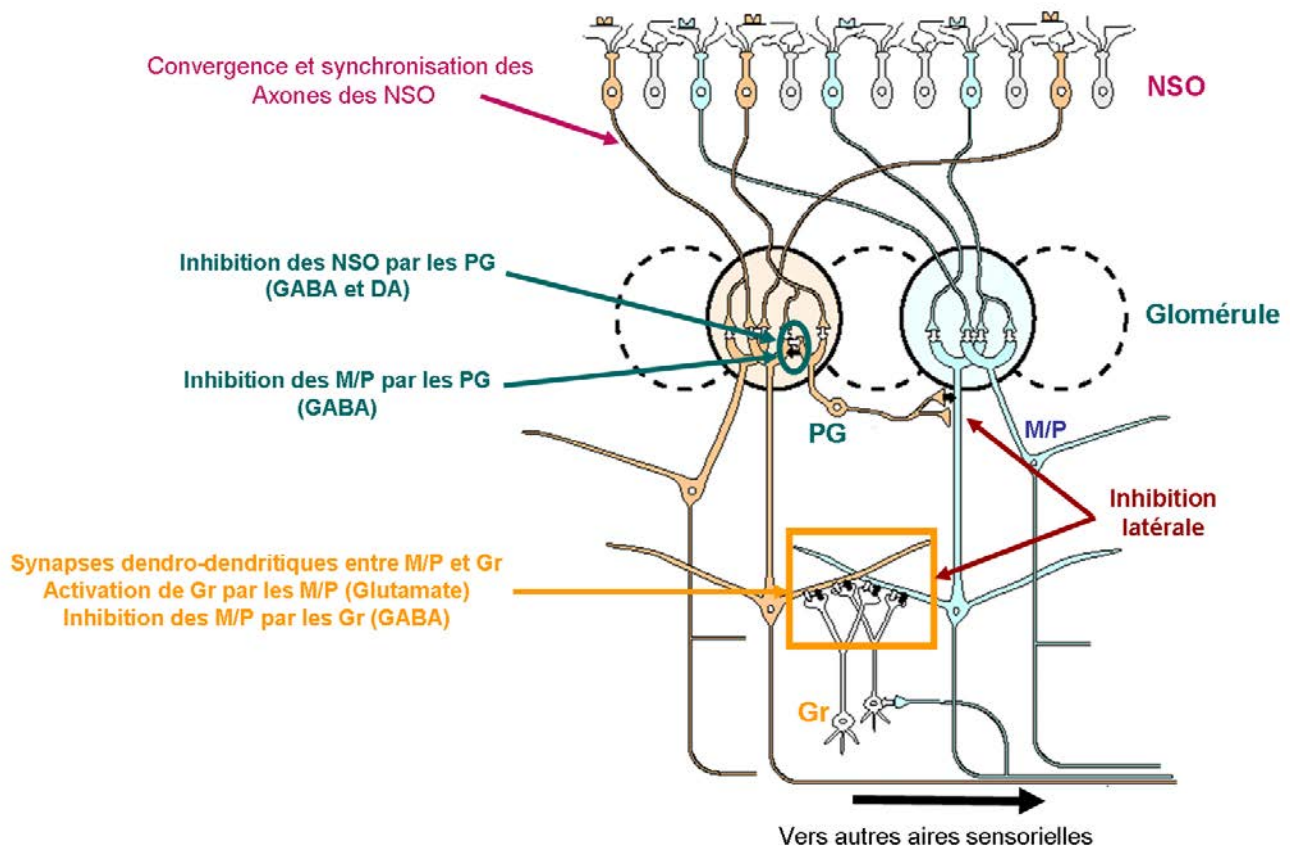


Figure A16 : Synaptologie bulbaire. Le décodage de l'information olfactive au niveau du BO se fait à deux niveaux : *via* la synaptologie glomérulaire et *via* la synaptologie granulaire. Les axones d'un même type de NSO (en **jaune** ou en **bleu**) convergent au sein d'un glomérulaire spécifique. Notez que l'inhibition latérale se fait à deux niveaux. Au niveau **glomérulaire**, les PG limitent la quantité d'information olfactive entrant dans le glomérulaire et modèrent la réponse des neurones relais à cette information. Au niveau **granulaire**, les Gr affinent et augmentent le contraste de la réponse évoquée par les odeurs au sein de chaque colonne fonctionnelle. Adapté de Mori et al., 1999.

1.2.2.2. Synaptologie Granulaire

Dans la *couche plexiforme interne*, les dendrites latérales des *cellules relais* s'étendent horizontalement sur plusieurs centaines de micromètres et établissent de nombreux contacts synaptiques **dendro-dendritiques** avec les dendrites des *cellules granulaires* (*Gr*) (Doty, 2012a ; Mori et al., 1999 ; Price & Powell, 1970) (Figure A16). Les dendrites des *cellules relais* activées vont ainsi libérer du **glutamate** sur les dendrites des *Gr* (Doty, 2012b). Les *Gr* ainsi activées vont en retour libérer du **GABA** et inhiber les dendrites latérales des *cellules relais*.

Par ailleurs, compte tenu de leur supériorité numérique, une cellule granulaire excitée peut contacter et inhiber de nombreuses cellules relais adjacentes à la cellule mitrale ou à panache responsable de son excitation. Ce phénomène d'**inhibition latérale** va permettre de restreindre l'étendue spatiale de l'activation des cellules relais en réponse aux odeurs (Yokoi et al., 1995).

Il est à noter que les différents types cellulaires du BO semblent s'organiser en **colonnes fonctionnelles** ou « *clusters* » (groupe restreint et bien défini de synapses entre les cellules (Migliore et al, 2015 ; Willhite et al, 2006)). En effet, chaque glomérule reçoit les terminaisons axonales de NSO portant le même récepteur olfactif, et les cellules mitrales connectées à un même glomérule, ainsi que les interneurons qui en modulent l'activité sont regroupés spatialement (Willhite et al., 2006).

Ainsi, les phénomènes de *convergence* et d'*inhibition latérale* engendrés au niveau des couches *glomérulaire* et *plexiforme interne* vont permettre d'**affiner** et d'**augmenter le contraste** de la réponse évoquée par les odeurs au sein de chaque *colonne fonctionnelle*, qui est ensuite transmise aux étages cérébraux supérieurs (Mori et al., 1999 ; Migliore et al, 2015 ; Willhite et al, 2006).

1.2.2.3. Projections centripètes et centrifuges du bulbe olfactif

Le rôle du BO est d'élaborer une représentation neurale de l'odorant à partir des signaux issus des NSO, mais également de moduler cette représentation en fonction des influences issues d'autres régions du cerveau. En effet, son activité est régulée par son réseau neuronal « local », mais également par des voies neuromodulatrices issues du SNC. Ainsi, l'odeur sera encodée dès le BO sous ses aspects perceptifs (identité, intensité...) et mnésiques (contextes, associations diverses...). On décrira ici, brièvement, les voies empruntées par l'information olfactive sortant du BO (qu'on appellera, par la suite voie « **centripète** »), ainsi que les voies neuromodulatrices arrivant au BO (qu'on appellera voie « **centrifuge** »).

1.2.2.3.1. Les projections centripètes du bulbe olfactif

A la sortie du BO, les projections glutamatergiques **excitatrices** des cellules relais suivent deux voies principales : une voie latérale et une voie médiane (Figure A17).

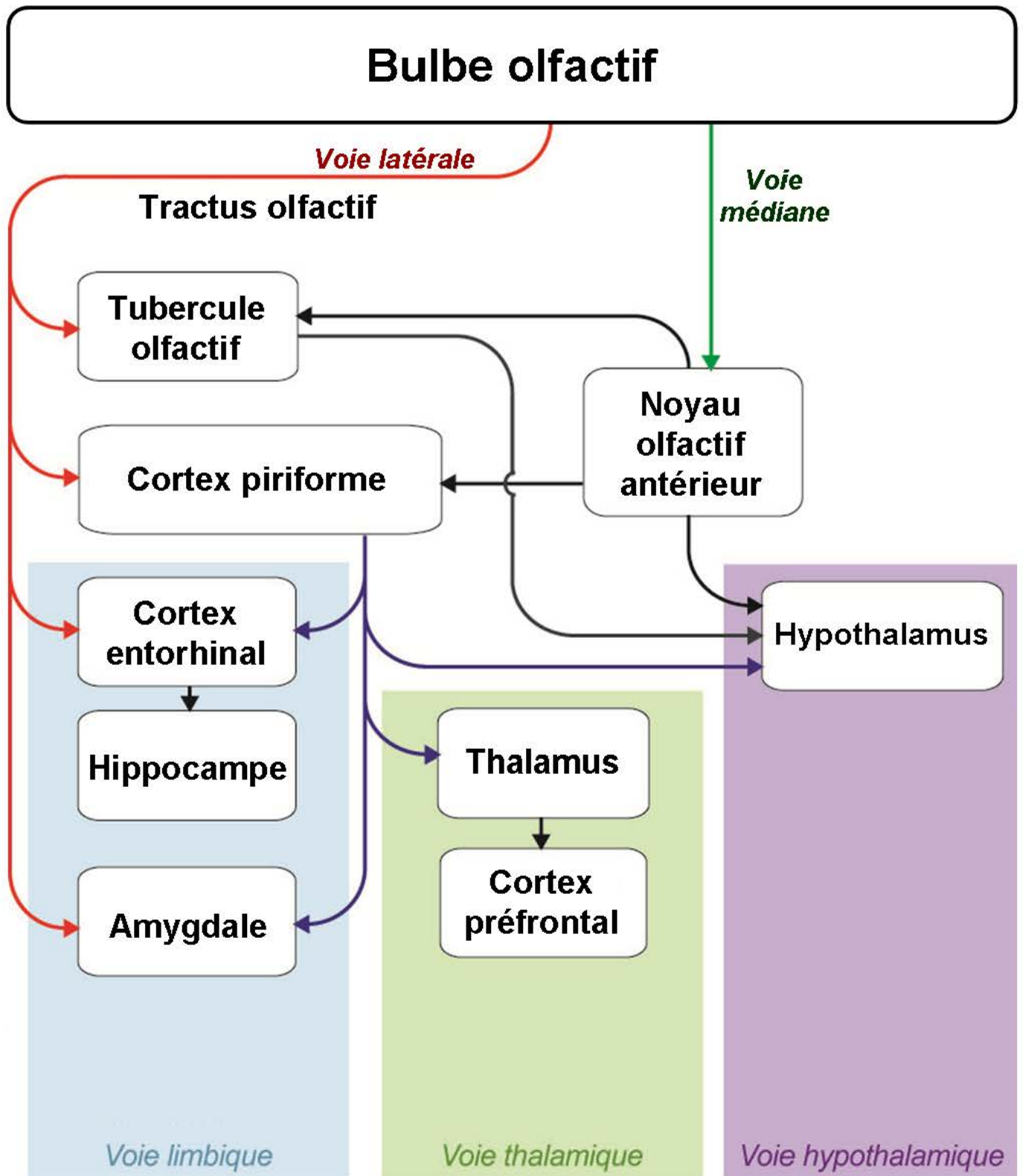


Figure A17 : Projections centripètes du bulbe olfactif. Les axones des cellules relais du bulbe olfactif, les cellules mitrales et les cellules à panache, empruntent deux voies principales. Par une *voie latérale* (en rouge), elles se projettent sur le tubercule olfactif, le cortex piriforme, le cortex entorhinal et l'amygdale. Par une *voie médiane* (en vert), elles se projettent sur le noyau olfactif antérieur. Les projections vers le cortex entorhinal et l'hippocampe, ainsi que l'amygdale constituent la *voie limbique*, alors que les projections vers le thalamus et le cortex préfrontal constituent, elles, la *voie thalamique*. Enfin, les projections vers l'hypothalamus forment la *voie hypothalamique*. Image adaptée de Aimé, 2010 et Jenkins et al., 2018.

Au niveau de la **voie latérale**, les axones myélinisés des cellules relais forment le *tractus olfactif latéral* (To) et se projettent directement sur plusieurs structures cérébrales comme le tubercule olfactif, le cortex piriforme, le cortex entorhinal et l'amygdale (Astic et al., 1993 ; Ennis et al., 2007 ; Imai et al., 2014).

Au niveau du *cortex piriforme*, les axones des les cellules pyramidales de ce cortex se projettent bilatéralement vers le cortex entorhinal, l'amygdale, le thalamus et l'hypothalamus (Astic et al., 1993).

Il est important de noter que, puisque le cortex entorhinal est la principale voie d'entrée de l'information dans l'hippocampe (Steward, 1976), les projections vers l'amygdale, le cortex entorhinal, puis l'hippocampe constituent la **voie limbique** des projections du système olfactif, associée à la confrontation de l'environnement olfactif à l'expérience cognitive mnésique et émotionnelle vécue.

La **voie thalamique** des projections du système olfactif est constituée par les projections du cortex piriforme qui atteignent le thalamus et se projettent ensuite vers le cortex préfrontal (Price et al., 1991). Cette voie thalamo-corticale est associée à une analyse fine et aux diverses capacités de traitement de l'information olfactive.

Au niveau de la **voie médiane**, les axones des cellules relais se projettent principalement sur le noyau olfactif antérieur (Astic et al., 1993 ; Ennis et al., 2007), qui constitue notamment une voie d'association interbulbaire (Astic et al., 1993). Le *noyau olfactif antérieur* se projette vers le cortex piriforme, le tubercule olfactif et l'hypothalamus (Price et al., 1991 ; Astic et al., 1993), formant ainsi la voie hypothalamique des projections du système olfactif (Aimé et al., 2010 ; Ennis et al., 2007). Cette **voie hypothalamique** est associée à la confrontation de l'environnement olfactif à l'état interne, tel que l'état alimentaire et métabolique de l'organisme.

L'ensemble de ces connections neuroanatomiques permet ainsi le traitement des odeurs sur le plan émotionnel (amygdale et cortex préfrontal), la mémoire (hippocampe), les interactions métaboliques (hypothalamus) ou encore le circuit de récompense (cortex préfrontal).

Concernant la connectivité entre le BO et les diverses aires cérébrales, il est important de mentionner ici que les cellules relais contactent directement les neurones des diverses structures. A leur entrée, la ségrégation topographique spatiale observée dans le BO disparaît et les axones se dispersent dans les structures supérieures, permettant aux neurones des différentes structures cérébrales de recevoir l'information olfactive, menant ainsi à l'identification de l'odeur, le relais de l'information olfactive et l'intégration de l'expérience individuelle (Figure A18).

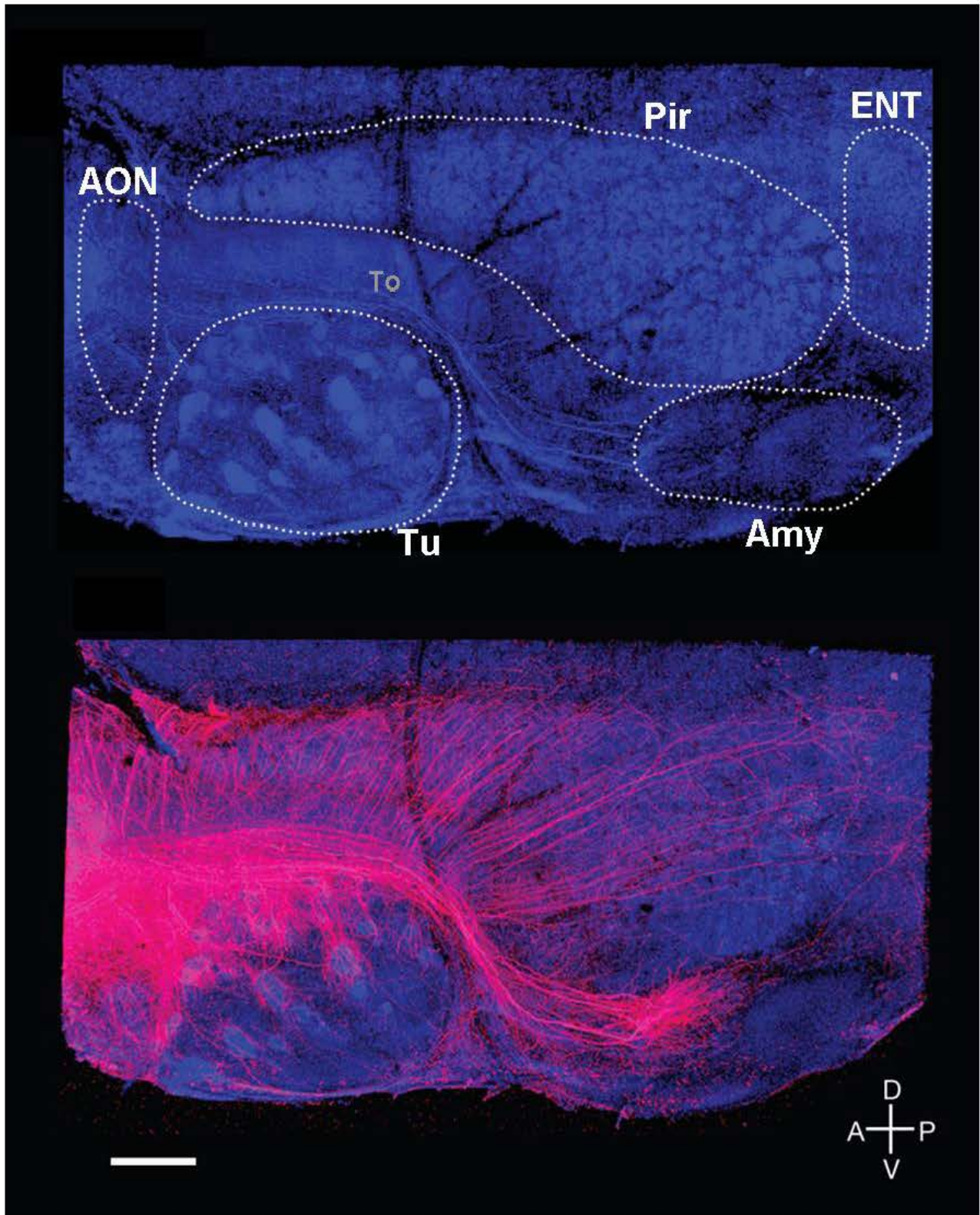


Figure A18 : Connectivité entre le bulbe olfactif et diverses aires cérébrales. Les axones des cellules relais du BO (Cellule mitrale et cellule à Panache) connectées à un seul glomérule présentent des motifs distincts de projections sur de multiples zones du cortex olfactif. La **figure du haut** présente une coupe longitudinale de cerveau de souris dans laquelle diverses structures cérébrales des deux voies principales centripètes (voie latérale et voie médiane) sont délimitées (en blanc). La **figure du bas** présente une coupe longitudinale de cerveau de souris où les projections axonales issues des cellules relais d'un seul glomérule ont été marquées au TMR-dextran. Notez le modèle unique des projections (en **rose**) dans chacune des zones olfactives. Barre d'échelle : 700 μ m. **A** : Partie antérieure ; **AON** : Noyau olfactif antérieur ; **Amy** : Amygdale ; **D** : Partie dorsale ; **ENT** : Cortex entorhinal ; **P** : Partie postérieure ; **Pir** : cortex piriforme ; **To** : Tractus olfactif ; **Tu** : Tubercule olfactif ; **V** : Partie ventrale. Image adaptée de [Sosulski et al., 2011](#).

1.2.2.3.2. Les projections centrifuges du bulbe olfactif

Les projections centrifuges du BO sont de deux types : 1) les rétroprojections des structures centrales olfactives sur lesquelles se projette le BO, ainsi que les projections de l'hypothalamus, et 2) les projections des systèmes neuromodulateurs.

Concernant le premier point, on peut dire que d'une manière générale, toutes les structures cérébrales sur lesquelles se projette le BO l'innervent en retour (Figure A19). Ainsi, le BO reçoit des projections centrifuges du cortex piriforme, du noyau olfactif antérieur, du cortex entorhinal, de l'hippocampe, de l'amygdale ainsi que de plusieurs noyaux hypothalamiques (Aimé et al., 2010 ; Ennis et al., 2007 ; Imai, 2014).

Concernant le second point, les projections des systèmes neuromodulateurs sont constituées d'afférences cholinergiques, noradrénergiques, dopaminergiques et sérotoninergiques (Figures A19 et A20).

Le BO est la cible de projections **noradrénergiques** issues du locus coeruleus (Aimé et al., 2010 ; Ennis et al., 2007 ; Shipley & Adamek, 1984). Les fibres noradrénergiques innervent principalement les couches granulaire et plexiforme interne, et plus modérément les couches des cellules mitrales et plexiforme externe (McLean et al., 1989) (Figure A20). Ces projections semblent permettre de moduler l'habituation aux odeurs (Guerin et al., 2008).

Le BO reçoit également de nombreuses fibres **sérotoninergiques** en provenance des noyaux du raphé médian et dorsal (MnR et DRD, respectivement) (Aimé et al., 2010 ; Doty et al., 2012a ; Ennis et al., 2007 ; Shipley and Adamek, 1984 ; Steinfeld et al., 2015). Les fibres sérotoninergiques atteignent principalement la couche glomérulaire, et plus modérément les couches des cellules mitrales, plexiforme interne et granulaire (Aimé et al., 2010 ; Ennis et al., 2007). Cette voie sérotoninergique semble réguler l'activité glomérulaire dans le BO (Petzold et al., 2009)

Le BO est également la cible de projections **cholinergiques** en provenance du noyau de la bande diagonale de Broca (HdB), un noyau du complexe du télencéphale basal (Aimé et al., 2010 ; Ennis et al., 2007 ; Shipley & Adamek, 1984). A l'exception de la couche des arrivées axonales de NSO, les fibres cholinergiques atteignent la plupart des couches du BO, particulièrement les couches glomérulaire et plexiforme (Carson & Burd, 1980). La voie cholinergique semble être impliquée dans l'identification et la discrimination des odeurs chez les rongeurs (Doty et al., 1991 ; Mandaïron et al., 2006), ainsi que dans la perception des odeurs chez l'homme (Serby et al., 1989).

En plus de la production locale (assurée par le PG), le BO reçoit des projections **dopaminergiques** issues de la voie mésocorticolimbique. La voie mésocorticolimbique s'étend de l'aire tegmentale ventrale (VTA) au noyau accumbens (Acb) avec des projections vers l'amygdale (Amy), l'hippocampe (Hp), le tubercule olfactif (Tu) et le cortex préfrontal (CPF) (Doty, 2012a ; Hornykiewicz, 1971). Il est intéressant de noter qu'en plus de la voie mésocorticolimbique, une projection dopaminergique directe de la

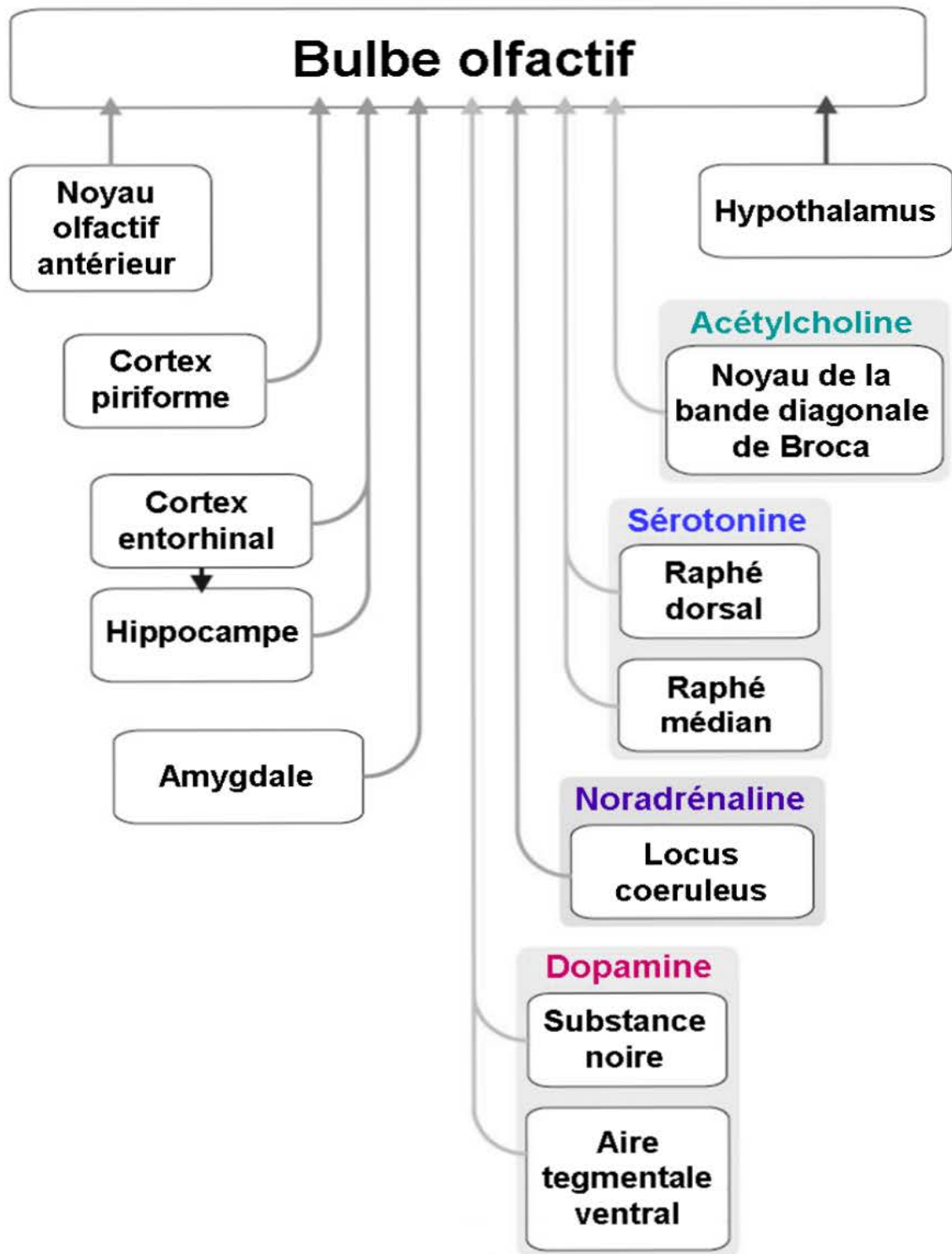


Figure A19 : Représentation schématique des projections centrifuges vers le bulbe olfactif. Les rétroprojections des structures centrales olfactives sur lesquelles se projette le bulbe olfactif sont figurées en gris. Figurent également les afférences **noradrénergiques**, **sérotoninergiques**, **cholinergiques** et **dopaminergiques**. Image adaptée de Aimé, 2010.

substance noire (SN) vers le BO a été décrite (Doty et al., 2012a). Cette voie a été suggérée comme impliquée dans la facilitation de la perception des odeurs chez le rat (Escanilla et al., 2009 ; Höglinger et al., 2015).

Ces systèmes neuromodulateurs semblent ainsi être largement impliqués dans les phénomènes d'apprentissage et de mise en mémoire des informations olfactives.

Sur la base de ces données neuro-anatomiques, il apparaît évident que toute perturbation des interactions nerveuses dans le cerveau (périphérique ou centrale), que ce soit au cours du développement ou à l'âge adulte, pourrait influencer les comportements liés à l'olfaction, comme la sensibilité aux odeurs, leur identification, discrimination et apprentissage, voire leur mémorisation à court ou long terme.

Les hypothèses permettant d'expliquer le lien entre déficits olfactifs et maladies neurodégénératives sont multiples. Au-delà des effets neurotoxiques et inflammatoires centraux, une diminution du nombre des NSO, ou de leur capacité à se renouveler via les cellules progénitrices pourrait expliquer la diminution de la sensibilité olfactive au niveau périphérique. Alternativement, une diminution de la densité des réseaux centrifuges en direction des interneurons modulateurs pourrait également affecter le traitement des odeurs. Cependant, aucune étude n'a caractérisé la part des atteintes de la muqueuse, du bulbe ou du reste du cerveau dans le processus neurodégénératif liés à une exposition aux nanoparticules (Ajmani et al., 2016).

1.2.3. Les particules inhalées peuvent atteindre directement le SNC par voie olfactive et participer à des dysfonctionnements neuronaux

Des rapports indiquent que les particules ultrafines déposées au niveau de l'épithélium olfactif peuvent se répartir dans tout le cerveau du fait d'une absorption et d'un transport axonal rétrograde via les nerfs olfactif et trigéminal (Bencsik et al., 2018 ; Elder et al., 2006; Oberdorster et al., 2004, 2009). En effet, divers composés métalliques (manganèse, fer, cadmium, thallium, mercure, cobalt, zinc) ainsi que des particules de carbone ont été montrés comme pouvant pénétrer rapidement dans le cerveau après une exposition par inhalation ou par instillation intranasale dans différentes espèces de mammifères dont des primates humains et non-humains (Calderón- Garcidueñas et al., 2008a, 2008b ; Dorman et al., 2006 ; Elder et al., 2006; Hopkins et al., 2014 ; Ibanez et al., 2014 ; Heusinkveld et al., 2016 ; Oberdorster et al., 2004).

Ces particules, après s'être déposées dans la région olfactive de la cavité nasale, peuvent migrer le long des axones des NSO vers le BO pour ensuite être acheminées par transport axonal vers diverses structures du SNC, telles que le cortex piriforme, le tubercule olfactif, l'amygdale et le cortex entorhinal (Lucchini et al., 2011). Comme pour la voie systémique, il semblerait que leur transport par voie olfactive soit influencé par leurs propriétés physico-chimiques (Rao et al., 2003). Les mécanismes par lesquels ce transport se produit restent inconnus, bien que les caractéristiques de la couronne

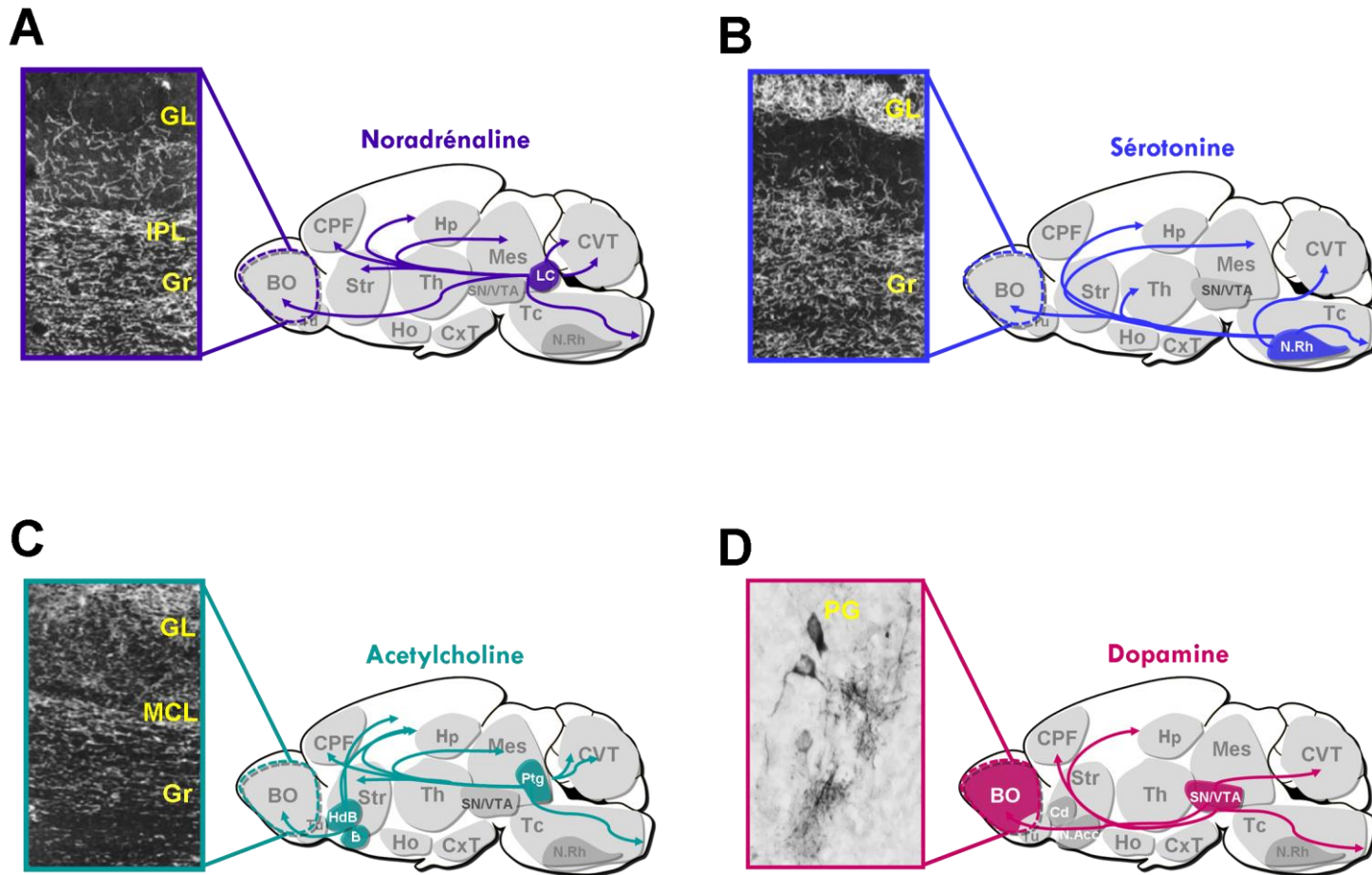


Figure A20 : Projection des systèmes neuromodulateurs vers le bulbe olfactif. **A.** Les fibres noradrénergiques, issues du locus coeruleus, innervent principalement les couches granulaire et plexiforme interne. **B.** Les fibres sérotoninergiques, en provenance des noyaux du raphé médian et dorsal atteignent principalement la couche glomérulaire. **C.** Les projections cholinergiques en provenance du noyau de la bande diagonale de Broca atteignent la plupart des couches du bulbe olfactif. **D.** En plus de la production locale (assurée par le **PG**), le BO reçoit des projections dopaminergiques issues de l'aire tegmentale ventrale et de la substance noire. **AcB** : Noyau Accumbens ; **B** : Noyau basal de Meynert ; **BO** : Bulbe Olfactif ; **Cd** : Caudé ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **HdB** : Bande diagonale de Broca (noyau horizontal) ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **N.Rh** : Noyaux du Raphé ; **Ptg** : Noyau tegmental pédonculopontin ; **SN/VTA** : Substance noire/ Aire tegmentale Ventrale ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus ; **Tu** : Tubercule olfactif ;. Image inspirée de Dos Santos Coura & Granon, 2012.

protéique autour de la particule semblent jouer un rôle ([Genter et al., 2009](#); [Ruiz et al., 2015](#) ; [Sunderman, 2001](#)).

Plusieurs études suggèrent que le transfert de nanoparticules dans le cerveau *via* la voie olfactive/trigeminale entraîne des dysfonctionnements précoces de l'olfaction, la présence de particules dans les tissus olfactifs ayant pour conséquence l'accumulation d'agrégats protéiques dans ces derniers, de possibles lésions tissulaires à divers niveaux et des troubles neurocomportementaux liés à l'olfaction ([Calderón-Garcidueñas et al, 2001,2008a, 2008b, 2010](#) ; [Ibanez et al, 2014](#) ; [Kinoshita et al, 2008](#) ; [Levesque et al, 2011a, 2011b](#) ; [Peters et al, 2006](#) ; [Win-Shwe et al, 2011](#)).

En outre, les études expérimentales ont mis en évidence une dérégulation des systèmes dopaminergique et sérotoninergique qui participent à la modulation du système olfactif ([Yokota et al, 2009, 2013, 2016](#) ; [Suzuki et al., 2010](#)). De façon intéressante, ces altérations des systèmes neuromodulateurs sont associées à des dysfonctionnements olfactifs (tels que des déficiences d'identification, de discrimination ou de mémorisation des odeurs), caractéristique commune à de nombreux troubles précédant les symptômes cognitifs et moteurs associés aux maladies neurodégénératives ([Doty et al, 2012b, 2012c](#) ; [Rey & Wesson, 2018](#)).

Des études *post-mortem* réalisées chez l'Homme ont ainsi mis en évidence chez des enfants et des jeunes adultes résidant dans des zones fortement polluées une accumulation de particules dans le système olfactif ainsi qu'une surexpression de médiateurs inflammatoires dans ces mêmes tissus, avec pour conséquence de possibles troubles olfactifs, tels que mis en évidence par le test d'identification des odeurs de l'Université de Pennsylvanie (UPSIT) ([Calderón-Garcidueñas et al, 2008a, 2010](#)).

L'ensemble de ces travaux suggère donc bien que la pollution atmosphérique peut mener à des modifications du fonctionnement des réseaux olfactifs périphériques comme des réseaux présents dans les structures cérébrales plus intégratives ([Calderón-Garcidueñas et al, 2008a, 2008b](#) ; [Doty et al, 2012a, 2012b](#) ; [Rey et al, 2018](#) ; [Peters et al, 2006](#)).

1.3. Le fœtus pourrait être exposé aux particules par voie systémique et olfactive au cours du développement

L'extrapolation des résultats obtenus par les travaux menés sur le tabagisme maternel d'une part, et les caractéristiques connues des PFD telles qu'exposées auparavant d'autre part, permettent de proposer que l'exposition gestationnelle aux PFD pourrait résulter de mécanismes différents, mais non exclusifs : les polluants atmosphériques (dont les nanoparticules) pourraient traverser le placenta *via* la circulation maternelle et atteindre le cerveau par **voie systémique** et mener *in fine* à une toxicité neuronale tel qu'exposé auparavant (Section introductive, Partie III, Chapitre 1.1). A noter qu'il est possible qu'une inflammation systémique maternelle liée à

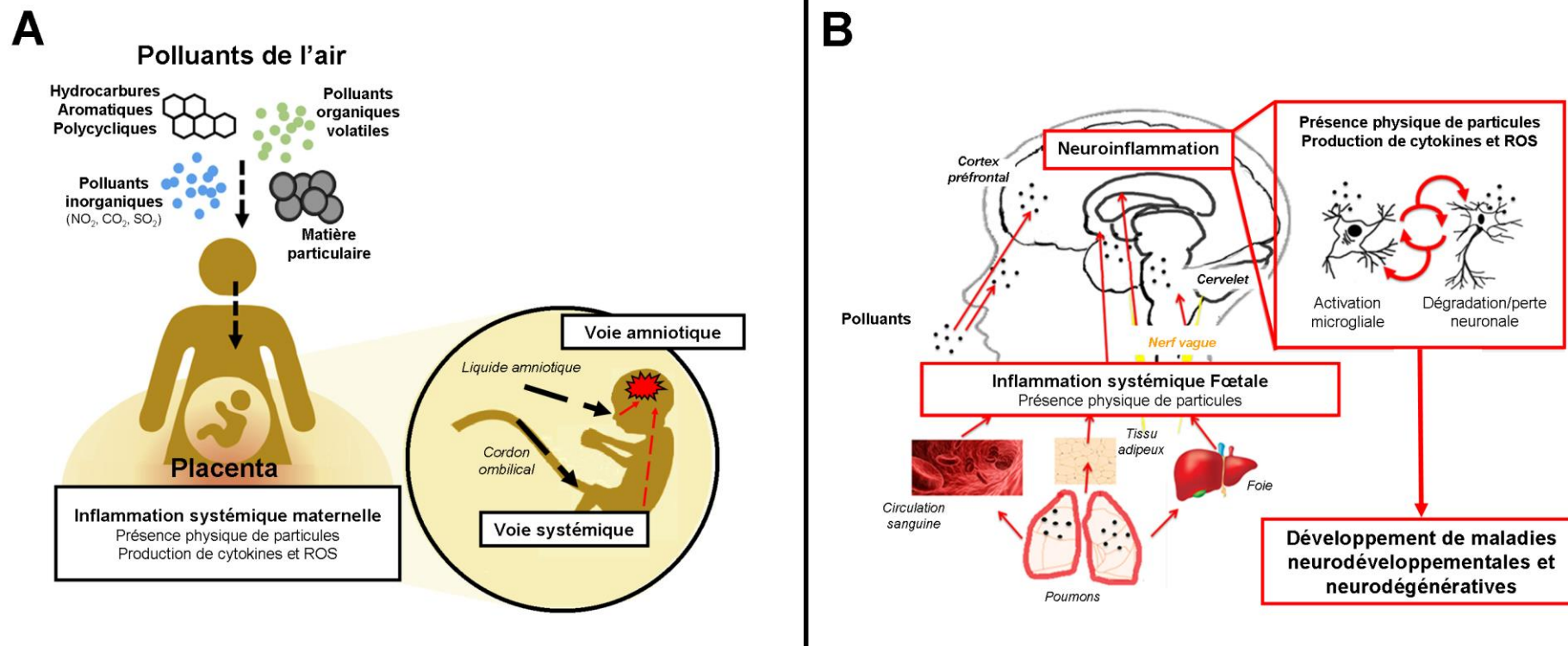


Figure A21 : Les polluants inhalés par la mère peuvent atteindre le SNC fœtal et altérer la mise en place et le maintien des circuits neuronaux. A. Représentation schématique des possibles voies par lesquelles les polluants pourraient atteindre le SNC fœtal. **B.** Représentation graphique des possibles effets de l'exposition à la pollution atmosphérique sur le neurodéveloppement fœtal. Images adaptées de [Kim et al., 2018](#) et [D'Angiulli et al., 2018](#).

l'exposition puisse coexister et participer à un effet neurotoxique exacerbé de l'exposition gestationnelle aux PFD chez le fœtus.

Ces particules pourraient également se concentrer dans le **liquide amniotique**, ce qui permettrait aux PFD d'interagir avec les *voies olfactive et trigémée du fœtus*, et atteindre ainsi le cerveau (Bencsik et al., 2018 ; Kim et al., 2018 ; Luck, et al., 1985). En effet, les narines du fœtus sont ouvertes dès le cinquième mois de grossesse chez l'homme, ce qui permet aux voies aériennes d'être directement exposées aux polluants concentrés dans le liquide amniotique ; le système olfactif, lui, est fonctionnel dès le dernier tiers de gestation chez la plupart des mammifères, l'essentiel des systèmes neuromodulateurs étant déjà en place chez l'homme (Sarnat et Yu, 2015 ; Sarnat et al., 2017).

Il ne faut pas non plus écarter la possibilité qu'elles soient absorbées par déglutition ou par voie cutanée pour ensuite être transloquées vers le cerveau par voie systémique ; on parlera par la suite de cette possibilité en parlant de **voie amniotique** (Figure A21A).

La translocation des particules *via* ces différentes voies dans le cerveau fœtal pourrait ainsi mener à une neuroinflammation *via* une activation microgliale et à une perte neuronale ce qui pourrait, à son tour, entraîner divers effets délétères sur la mise en place et le maintien des circuits neuronaux et ainsi augmenter le risque de troubles neurodéveloppementaux et neurodégénératifs (Bencsik et al., 2018 ; D'Angiulli, 2018) (Figure A21B).

2. Les dysfonctionnements olfactifs pourraient être considérés comme indicateurs précoces de neuropathologies dans des régions plus centrales

Depuis ces deux dernières décennies, plusieurs études ont montré que l'exposition à la pollution atmosphérique a un impact sur le SNC et mènerait à l'émergence de neuropathologies. Les individus vivant dans des régions fortement polluées présentent un risque accru de développer des maladies telles que les maladies d'Alzheimer ([Chen et al., 2017](#)) et/ou de Parkinson ([Calderón-Garcidueñas et al, 2015, 2016](#) ; [Calderón-Garcidueñas & Villeréal-Ríos, 2017](#) ; [Doty et al., 2012b, 2012c](#)). Ces personnes atteintes de telles maladies ou de troubles apparentés présentent également divers degrés de dysfonctionnement olfactif, suggérant ainsi que des modifications de la fonction olfactive pourraient constituer un marqueur de perturbations au niveau de structures cérébrales plus intégratives ([Calderón-Garcidueñas et al, 2008a, 2008b](#) ; [Doty et al, 2012a, 2012b](#) ; [Rey et al, 2018](#) ; [Peters et al, 2006](#)).

Bien que la base des dysfonctionnements olfactifs observés soit probablement multifactorielle, en particulier du point de vue de l'étiologie, les neuropathologies associées à de tels dysfonctionnements présentent également des altérations neuronales des systèmes neuromodulateurs au niveau bulbaire ([Doty et al., 2012b](#)). A titre d'exemple, des dérégulations de la voie sérotoninergique produisent une anosmie et une atrophie marquées des différentes couches du bulbe, suggérant ainsi que l'entrée de 5-HT est essentielle au maintien de l'intégrité du BO et en particulier des neurones dopaminergiques ([Doty et al., 2012b](#) ; [Moriizumi et al., 1994](#); [Tsukatani et al., 1995](#)). Du fait du continuum neuroanatomique et fonctionnel entre le BO et le reste du SNC, on peut supposer que les altérations sérotoninergiques du BO sont indicatrices de dérégulations neuromodulatrices des structures plus centrales.

Ainsi, du fait de ses nombreuses interactions avec le SNC, le système olfactif apparaît comme une structure de choix pour l'étude de troubles neuronaux chez l'adulte, et pourrait également renseigner sur l'intégrité du SNC au cours de la période gestationnelle, période critique de développement anatomique et fonctionnel cérébral.

Même si le système olfactif poursuit sa maturation après la naissance (Encadre 3), il est rapidement fonctionnel au stade fœtal avec la formation des contacts synaptiques dans le BO avec les axones des NSO permettant le développement des comportements indispensables à la survie du nouveau-né, en particulier pour son alimentation. La plupart des mécanismes de neuromodulation sont également en place, même s'ils vont continuer à évoluer par la suite.

Ces éléments expliquent que les mammifères présentent ainsi une attraction innée à l'odeur du liquide amniotique et au lait contenant des clefs olfactives communes ([Logan et al., 2012](#) ; [Al Aïn et al., 2013](#)). Ces réponses innées, bien caractérisées chez les insectes, sont médiées chez les mammifères par des circuits renforcés stéréotypés qui lient des NSO particuliers à des neurones spécifiques des centres supérieurs du bulbe

dorsal projetant vers l'amygdale dorsale ([Kakutani et al., 2007](#)). Par exemple, concernant la phéromone mammaire chez le lapereau, l'étude du gène précoce *c-fos* montre que le circuit d'activation de la phéromone implique des glomérules latéraux, le cortex piriforme antérieur et/ou postérieur selon l'âge du lapereau, l'habénula et certains noyaux hypothalamiques ([Charra et al., 2012, 2013](#) ; [Schneider et al., 2016](#)). La maturation des systèmes neuromodulateurs vont ensuite permettre d'affiner les capacités olfactives et guider les apprentissages en fonction de l'expérience maternelle et de l'environnement post-natal. Selon l'expérience ou l'apprentissage, la représentation neurale des odeurs sera modifiée à différents niveaux du circuit olfactif ([Kass et al., 2015](#) ; [Kato et al. , 2012](#) ; [Li et al., 2006, 2008](#)), ce qui démontre la plasticité extraordinaire du système de codage des odeurs, mais interroge également sur la fragilité de la mise en place et du maintien des circuits neuronaux en cas d'exposition à des agents physiques.

Ainsi, on peut supposer que l'étude de la fonctionnalité du système olfactif à la naissance (bien qu'immature) *via* la mesure de la réponse comportementale à des odeurs innées et son suivi régulier au cours de la période post-natale, pourrait apporter des informations sur de possibles défauts de maturation des régions corticales supérieures liés à une exposition prénatale.

OBJECTIFS DE THESE

Comme nous l'avons vu précédemment, les données épidémiologiques ainsi que les études expérimentales suggèrent que l'émission de particules fines liée au trafic automobile serait à l'origine de **troubles neurodégénératifs** pouvant entraîner des pathologies graves dans des populations **directement exposées** (Block et al, 2010 ; Calderón-Garcidueñas et al, 2008a, 2010 ; Fonken et al, 2011 ; González-Domínguez et al, 2014 ; Power et al, 2010 ; Ranft et al, 2009). Certaines études évoquent des **dysfonctionnements olfactifs** comme signes précurseurs observés avant l'apparition des symptômes cognitifs et moteurs liés à de nombreux troubles neurodégénératifs, y compris chez l'enfant (Calderón-Garcidueñas et al, 2001, 2008a ; Doty et al, 2012c ; Peters et al, 2006 ; Rey et al, 2018).

Au cours de la dernière décennie, des **études épidémiologiques** ont également mis en évidence 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 ; Freire et al, 2010 ; Guxens et al, 2014, 2015 ; Harris et al, 2016 ; Lanphear et al, 2015 ; Siddique et al, 2011). De plus, des **études expérimentales** ont montré que l'exposition gestationnelle aux polluants atmosphériques induit des **altérations structurelles et moléculaires** dans les tissus cérébraux [affectant notamment la neurochimie (Suzuki et al., 2010 ; Yokota et al, 2009, 2013, 2016), l'expression des gènes (Bolton et al, 2013, 2014, 2017 ; Tsukue et al., 2009 ; Yokota et al, 2015) et les processus cellulaires (Bolton et al, 2014, 2017 ; Klocke et al., 2017 ; Sugamata et al, 2006a, 2006b)], pouvant conduire à des **troubles cognitifs et comportementaux postnataux** (Bolton et al, 2013, 2014, 2017 ; Hougaard et al, 2008, 2015 ; Suzuki et al., 2010 ; Yokota et al, 2009, 2013, 2015, 2016) suggérant des effets à long terme sur la santé.

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 et peu nombreux. De plus, il y a peu d'éléments permettant de faire un lien mécanistique ou de trouver une origine commune aux atteintes centrales et périphériques liées à la pollution atmosphérique. En particulier, le continuum anatomo-fonctionnel entre système olfactif et cerveau a été peu étudié pour sa prise en considération dans l'étiologie des maladies neurodégénératives. Peu d'études ont mesuré l'évolution des atteintes au cours du temps sur des modèles d'exposition précoce et contrôlée. Finalement, la plupart des études réalisées sur des modèles animaux miment de manière imparfaite l'exposition dans les conditions réelles (niveau et fréquence d'exposition, type de particules...) (Baio, 2014 ; Bolton et al, 2013, 2014, 2017 ; Davis et al., 2013 ; Ema et al, 2013 ; Klocke et al, 2017 ; Hougaard et al, 2008, 2015 ; Sugamata et al, 2006a, 2006b ; Suzuki et al., 2010 ; Wong et al, 2015 ; Yokota et al, 2009, 2013, 2016).

Etant donné la plasticité des tissus nerveux en réponse à l'exposition à divers polluants environnementaux lors du développement fœtal (Crépeaux et al, 2012, 2013 ; Peiffer et al, 2013, 2016), une exposition *in utero* à la pollution atmosphérique pourrait affecter le **cerveau** du fœtus à une **période critique de son développement**, et pourrait *in fine* induire à terme un risque accru pour l'individu de développer des **maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives** (Heusinkveld et al, 2016). De ce fait, plusieurs questions se posent, à savoir :

1. Quelles sont les répercussions d'une exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique enrichie en particules sur la maturation du système nerveux fœtal?
 - Peut-on mettre en évidence des atteintes anatomiques et fonctionnelles des circuits neuronaux centraux et périphériques avant la naissance? Un transfert de particules au niveau cérébral *via* le système olfactif ou le liquide amniotique est-il possible?
2. Comment le développement neuronal de la descendance se déroule-t-il suite à cette exposition?
 - Dans l'hypothèse d'une atteinte fœtale, y a-t-il des altérations anatomiques et fonctionnelles observables au niveau comportemental après la naissance ?
 - Peut-on établir un lien entre les potentiels désordres mécanistiques et les comportements observés ?
3. Ce type d'exposition *in utero* constitue-t-il une prédisposition de l'individu à l'apparition de neuropathologies ? Si oui, à quel type de neuropathologies ?

Mon travail doctoral s'inscrit donc ici dans une problématique qui vise à analyser les **répercussions d'une exposition gestationnelle aux fumées d'échappement de moteur diesel**, qui sont riches en nanoparticules, à des niveaux d'exposition proches de ceux auxquels les populations urbaines sont exposées en Europe, sur le **développement neuronal** de la descendance. L'originalité de ce travail est de se concentrer sur le **continuum anatomique** entre les **voies olfactives** (qui constituent une interface de première importance entre le milieu extérieur et le système nerveux central) et **différentes régions du cerveau**, impliquées dans la régulation des fonctions comportementales et cognitives. Il explore également deux stades de développement, le fœtus et l'adulte.

Afin étudier ces aspects, nous avons utilisé un modèle développé chez le lapin dans le cadre du programme de recherche ANR EPAPP (Effets de la Pollution Atmosphérique sur la fonction Placentaire et le développement Post-natal) (ANR-13-CESA-0011) qui est porté par un des partenaires du consortium du programme ANSES BrainAirPoll (PNR-EST 2014-1-190) dont relève ma thèse, le Dr Pascale Chavatte-Palmer (UMR BDR, INRA). Le programme EPAAP a pour objectif d'évaluer les effets d'une **exposition gestationnelle par voie nasale uniquement** (« Nose-Only »), sur le développement embryonnaire, foeto-placentaire et post-natal du lapin ainsi que les effets intergénérationnels d'une telle exposition (Valentino et al, 2016b). Le lapin a été choisi **comme modèle animal** en raison de son **mode de placentation** anatomiquement et fonctionnellement proche du modèle de placentation humaine (Fischer et al, 2012 ; Hougaard et al, 2015 ; Sugamata et al, 2006 ; Valentino et al, 2016a, 2016b).

Les conséquences d'une telle exposition survenant pendant la vie embryonnaire ont été évaluées sur deux grands axes :

- Un axe *in vivo*, qui s'intéresse à l'évaluation de la *réponse comportementale aux odeurs* des animaux des générations F1 à trois stades de développement post-natal (PND2, PND118 et PND190).
- Un axe post-mortem, qui s'intéresse, *via* des approches moléculaires, biochimiques et histologiques, à l'analyse de la *dérégulation de facteurs impliqués dans l'homéostasie et les fonctions du cerveau et du tractus olfactif* de génération F1 au stade foetal (28^e jour de vie foétale, GD28) et au stade adulte (216^e jour de vie postnatale), afin d'identifier de possibles atteintes neurologiques et les circuits mis en jeu.

Le déroulé de ma thèse a été organisé comme suit en lien avec la stratégie de valorisation des travaux établie dans le cadre du consortium BrainAirPoll. Ainsi, dans la suite de cette thèse, nous présenterons d'abord :

- Une **Section méthodologique**, les matériels et méthodes utilisés pour la mise en place du protocole expérimental ainsi que pour le suivi et l'analyse de la réponse comportementale et les paramètres biologiques évalués chez les fœtus et les adultes en fonction des stades d'intérêt.
- Une **Section expérimentale**, laquelle a été divisée en trois parties.
La première présentera les résultats obtenus suite à l'exposition maternelle aux particules de diesel sur la génération F1 sous la forme d'un article. Ils indiquent la présence de particules dans les tissus nerveux des animaux exposés et décrivent les effets sur le développement du système olfactif et nerveux au stade GD28 et sur les

comportements de reconnaissance olfactive des lapereaux au stage PND2 (**Partie 1**). La seconde s'interroge sur une éventuelle persistance de telles modifications à l'âge adulte par l'analyse des tissus nerveux et par une étude de discrimination olfactive menée à PND118, PND190 et PND216 (**Partie 2**).

- Une **Section Conclusive** permet de faire la synthèse des données obtenues et proposer des hypothèses, par rapport aux objectifs détaillés dans cette section, permettant ainsi d'expliquer les atteintes observées sur le plan mécanistique et discuter des limites de cette étude.
- **Différentes annexes**, constituées entre autres de tableaux de synthèse, schémas récapitulatifs et explicatifs ou encore des publications principales afférentes à la communication de mes résultats (publication, posters), permettent de clore ce manuscrit.

SECTION METHODOLOGIQUE

Partie I – Expérimentation animale

<u>1</u>	Procédure expérimentale d'exposition	52
<u>2</u>	Démarche expérimentale	54

Tableau B1. Composition flux de gaz d'échappement de moteur diesel

Concentration massique en particules ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Concentration particulaire ($\#/ \text{m}^3$)	Surface alvéolaire (nm^2/cm^3)	Diamètre moyen des particules (nm)	NO_x (ppm)	NO (ppm)	NO₂ (ppm)	CO (ppm)
1014 $\pm$ 133	2585000 $\pm$ 249000	6420 $\pm$ 1000	69 $\pm$ 1	25.9 $\pm$ 3.6	25.2 $\pm$ 3.8	0.7 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.4

Tous les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité relative $\pm$ ESM. CO : Monoxyde de carbone ; NO : Monoxyde d'azote ; NO₂ : Dioxyde d'azote; NO_x : Oxydes d'azote. Adapté de [Valentino et al, 2016a, 2016b](#).

1. Procédure expérimentale d'exposition

1.1. Le choix du lapin comme modèle expérimental

Au-delà de ses caractéristiques générales, qui font que le lapin est le 3ème modèle animal mammifère utilisé en Europe (2,78%), après la souris (59,3%) et le rat (17,7%), des raisons spécifiques ont justifié le choix de cette espèce dans le cadre du programme EPAPP à l'origine de mon travail de thèse.

En effet, le lapin a été choisi **comme modèle animal** en raison de:

1. Son **mode de placentation**, anatomiquement et fonctionnellement proche du modèle de **placentation humaine** (Fischer et al, 2012 ; Hougaard et al, 2015 ; Sugamata et al, 2006 ; Valentino et al, 2016b).
2. Sa **taille**, adéquate pour la réalisation des **suivis échographiques** de croissance foeto-placentaire.
3. La **taille de la portée**, qui peut être de 7 à 12 fœtus.
4. La **taille de l'embryon**, permettant une dissection facile des divers organes d'intérêt.
5. Son **temps de gestation court** (30-32 jours).
6. Sa **période intergénérationnelle courte** (autour d'un an), permettant l'analyse des effets intergénérationnels.
7. Les **homologies de séquences nucléotidiques avec l'homme**, permettant des analyses transcriptomiques en fonction des tissus d'intérêt.

1.2. Animaux

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 lapines ont été hébergées dans les locaux de l'UCEA (Unité Commune d'Expérimentation Animale) sur le site INRA de Jouy-en-Josas. Les animaux étaient dans des cages individuelles présentant des plateformes en guise d'enrichissement (Annexe 2).

La nourriture, des croquettes issues de AGRALYS - THOREAU (Stabiplus pour les mâles et femelles non allaitantes, ou Stabipro pour les femelles en gestation -dernier tiers de gestation- et les femelles en lactation), était proposée de manière individuelle, distribuée à sec et à volonté (leurs trémies étaient réalimentées en cas de besoin) ; l'eau était *ad libitum* (Annexe 2).

1.3. Matériel et conditions d'exposition mis en place

Le modèle d'exposition a consisté à exposer les lapines gestantes par inhalation (nose-only, Annexe 3) à une atmosphère dont la concentration en particules de fumées

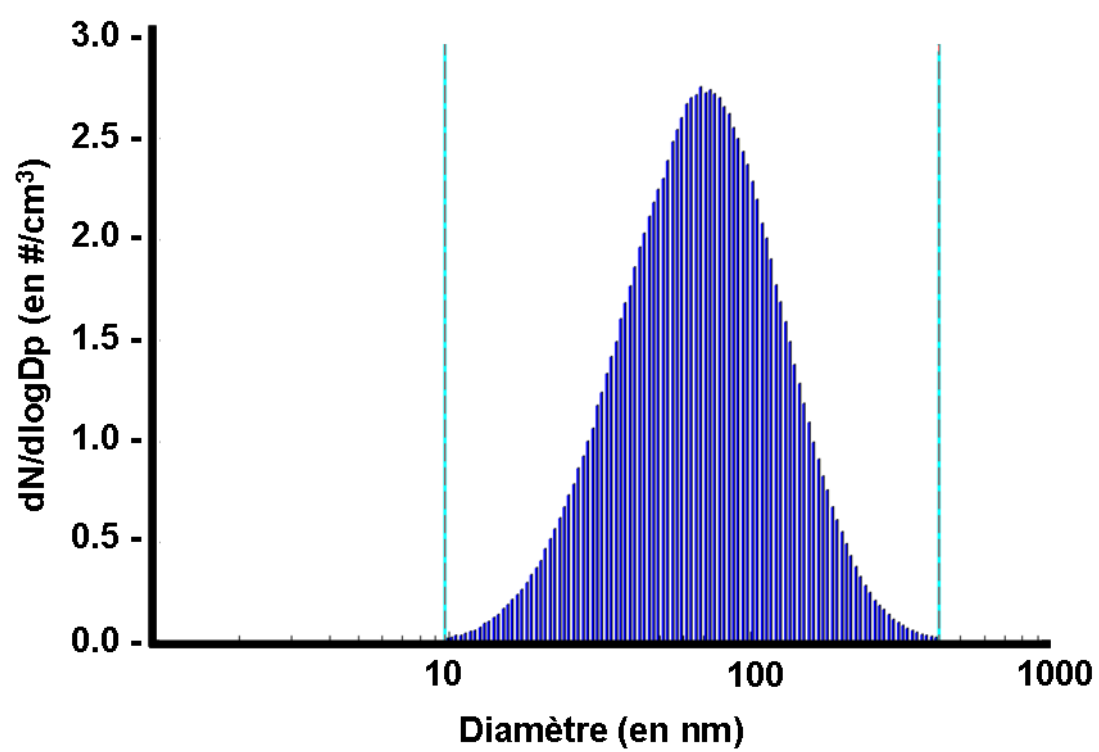


Figure B1 : distribution de la taille des particules lors de l'exposition. Adapté de [Valentino et al, 2016a, 2016b](#).

de diesel a été ajustée et contrôlée à **1 mg/m³**, deux fois 1h/ jour, cinq jours par semaine **du 3^{ème} au 27^{ème} jour de gestation** ^[1].

Les animaux contrôles ont été exposés selon le même protocole à de l'air ambiant dépourvu en particules (Annexe 4a). L'ensemble des expositions a été réalisé avant mon arrivée dans l'unité d'accueil.

L'exposition a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Flemming CASSEE du National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), en utilisant le **laboratoire mobile MAPCEL** (Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory) relié à un **moteur diesel 25KVA** de l'entreprise Loxam, moteur de référence de l'équipe du RIVM (Annexe 4b).

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 a été réduit, puis mélangé à de l'air ambiant préalablement filtré pour réguler la concentration moyenne en particules.

Les paramètres d'exposition ont été gérés et contrôlés en continu tout le long de l'expérimentation, ce qui a permis d'assurer des conditions d'exposition idéales et reproductibles d'un animal à l'autre selon les paramètres suivants :

1. Température : 21-23°C
2. Humidité relative : 40-45%
3. Concentration en gaz et particules (Tableau B1)

La métrologie des nuages particuliers a montré un diamètre moyen de 69 ± 1 nm (avec une valeur minimale et maximale de 10 et 500 nm, respectivement), montrant que l'exposition a été faite avant tout avec un mélange enrichi en particules de taille nanométrique (Figure B1).

Les calculs ont tenu compte des paramètres physiologiques respiratoires du lapin, montrant que l'inhalation de cette atmosphère contaminée deux fois 1H par jour correspond à une inhalation continue sur 24H d'une concentration en particules de **80 µg/m³**. Par la suite, et par facilité d'écriture, on parlera de PFD pour décrire la fumée de diesel enrichie en particules telle que présentée ici.

On remarque que, si la concentration moyenne quotidienne en particules est ici supérieure aux normes recommandées par l'OMS en cas de pollution aérienne aux particules fines (PM_{2,5}) excessive (qui s'élève à 30 µg/m³ pour le **seuil de recommandation** et à 50 µg/m³ pour le **seuil d'alerte**), les particules présentes dans le mélange appartiennent majoritairement à la classe des particules ultrafines (UFPM), classe de particules insuffisamment étudiée pour être réglementée, et pour lesquelles actuellement aucune recommandation claire n'est établie ([ANSES, 2018](#) ; [OMS, 2005](#) ; [WHO, 2013](#)) (Section introductive).

[1]. L'exposition a débuté à GD3 afin de ne pas perturber l'ovulation induite par la saillie, ni le développement embryonnaire précoce.

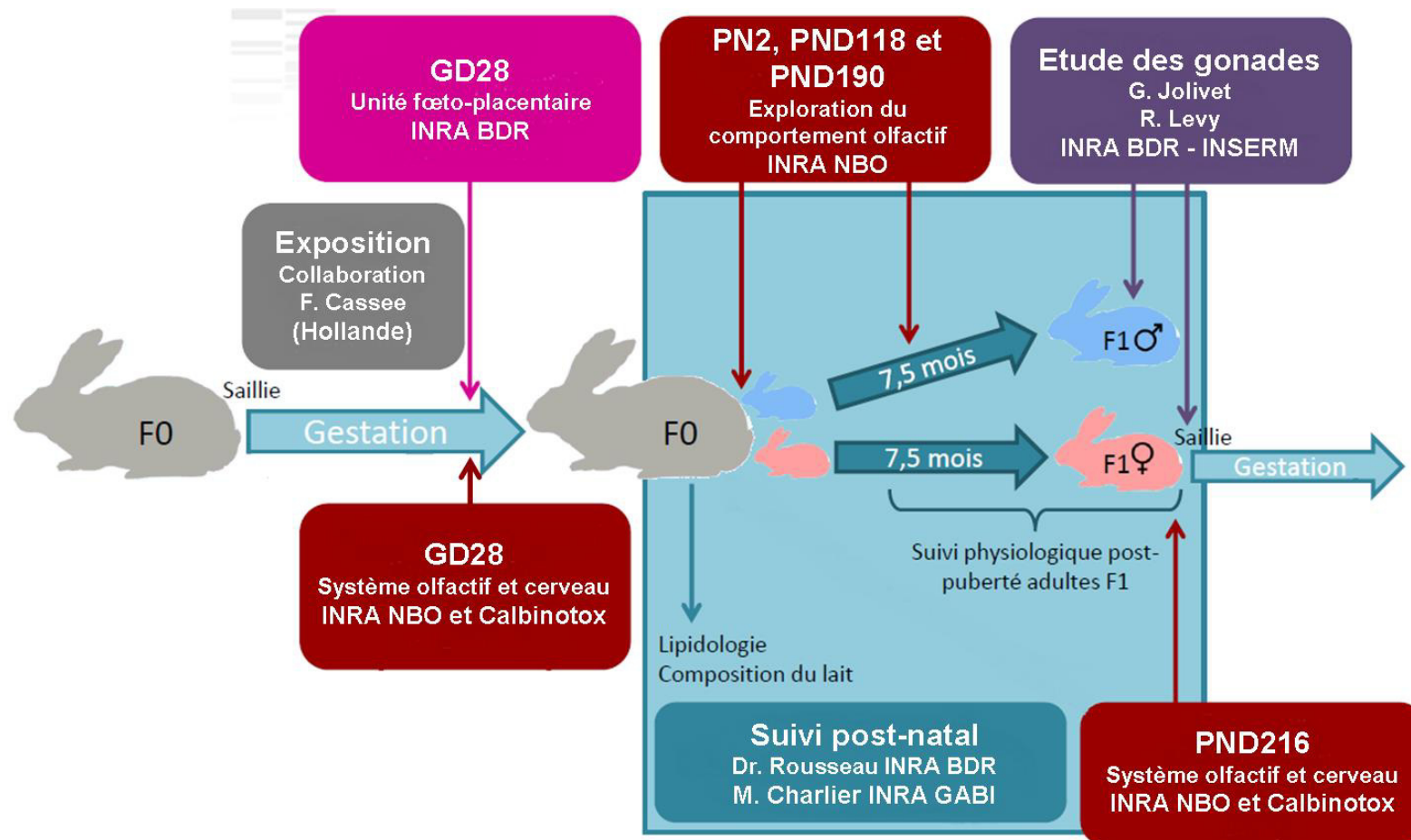


Figure B2 : Représentation graphique des différents intervenants. Au stade GD28, les unités fœto-placentaires F1 et F2 ont été collectés (sujet de thèse du Dr. Sarah Valentino) et le développement des glandes mammaires F0 et F1 a été suivi. De la naissance à l'âge adulte, le poids des animaux F1 a été suivi, un suivi physiologique a été effectué sur les animaux F1 de 4,5 à 7,5 mois. Les gonades ont été prélevées chez les fœtus des 2 générations ainsi que chez les adultes F1. Le projet BrainAirPoll (sujet de cette thèse) apparaît en rouge sur ce schéma. Adapté de Valentino et al, 2016b.

2. Démarche expérimentale

Afin de limiter de possibles effets liés au stress, les lapines ont été habituées pendant deux semaines à la mise en **contention** et à la **manipulation**, ainsi qu'aux **bruits provoqués par le moteur du matériel d'exposition** (Annexe 3). La dernière semaine avant le début des expérimentations, les animaux ont été habitués chaque jour à recevoir un flux d'air au niveau du museau, grâce à un petit module d'exposition. Afin d'obtenir des **groupes homogènes et comparables** pour la suite du protocole expérimental, une sélection des lapines en fonction de leur **degré d'habitation** et leur **poids** a été réalisée. L'ensemble des lapines a été sailli par des mâles témoins issus de la lapinerie du centre INRA de Jouy en Josas.

2.1. Plan de reproduction et séries d'étude

Pendant l'expérimentation, 16 lapines gestantes ont été exposées du **3ème jour de gestation (GD3) au 27ème jour de gestation (GD27)** à l'atmosphère polluée, selon les conditions décrites précédemment ; en parallèle, 14 lapines gestantes ont été exposées, dans les mêmes conditions, à une atmosphère non polluée (air ambiant filtré) (Annexe 4a).

Les lapines F0 ont été réparties dans 4 séries :

- Une première 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 deuxième série a donné naissance à la génération F1, laquelle a été suivie de la puberté jusqu'à l'âge adulte.
- Une troisième série incluant des femelles contrôles et exposées F1 a été mise en reproduction dans le but d'explorer les effets intergénérationnels de l'exposition chez des animaux de génération F2 ; ces lapines ont été euthanasiées à GD28.
- Enfin, une quatrième série a donné naissance à la génération F2, laquelle a été suivie de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Malheureusement, pour des raisons organisationnelles, seuls quelques animaux nés de mères F1 exposées ont pu être étudiés, sans pour autant disposer des lapins contrôles correspondants.

Les données issues de ces 2 dernières séries ne sont pas présentées ici.

2.2. Procédure expérimentale et collecte des tissus d'intérêt

Les animaux ont été mutualisés par plusieurs équipes afin d'étudier les effets de la pollution indirecte dans différents tissus (Figure B2). Pour ma part, je me suis donc intéressée aux tissus olfactifs et cérébraux.

Les femelles F0 (n=5 contrôles et n=7 exposées) ont été euthanasiées au 28^e jour de gestation (GD28) afin de prélever la muqueuse olfactive (MO), le bulbe olfactif (BO) et le

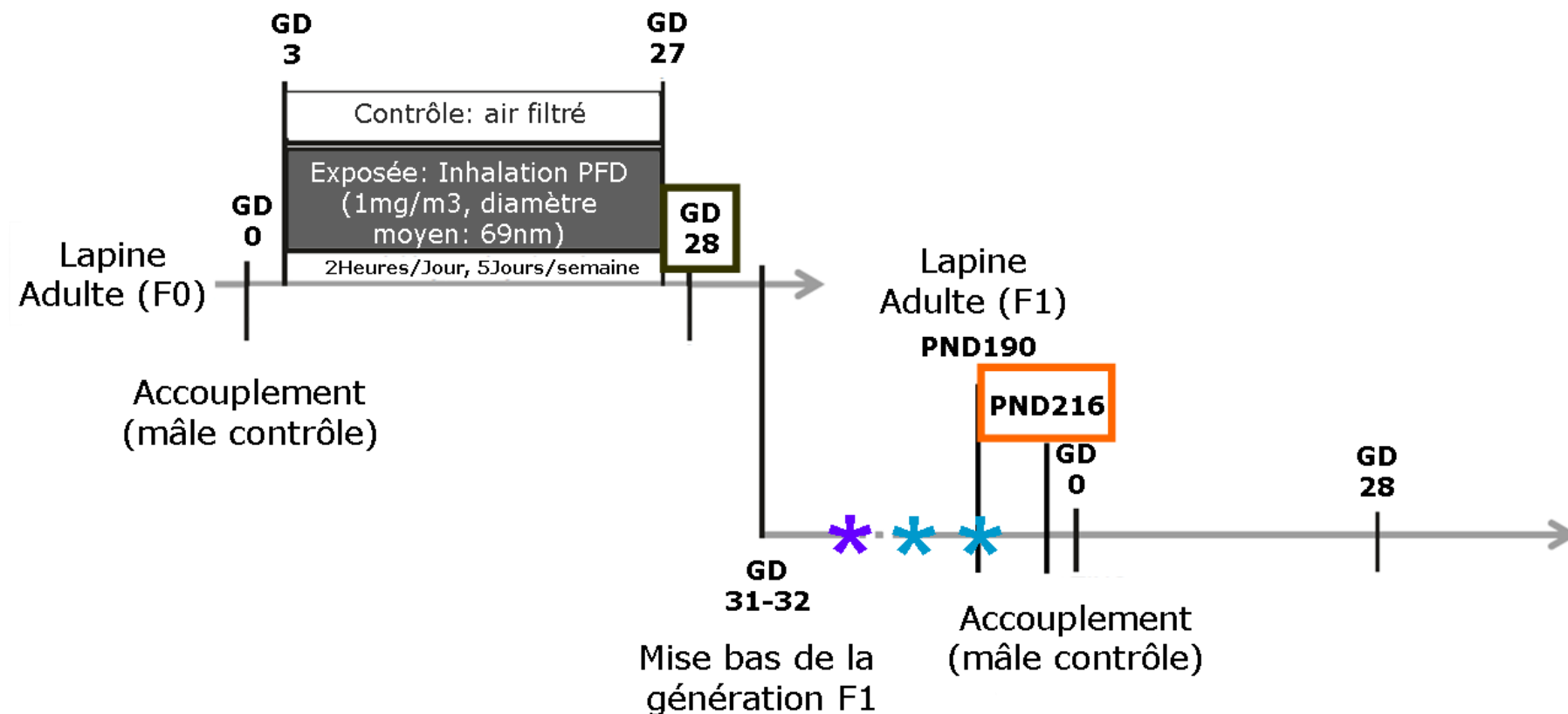


Figure B3 : Procédure expérimentale et collecte des tissus d'intérêt. 16 lapines gestantes ont été exposées du 3ème jour de gestation (GD3) au 27ème jour de gestation (GD27) à l'atmosphère polluée, dont la concentration en particules de fumées de diesel a été ajustée et contrôlée à 1 mg/m³, deux fois 1h/ jour, cinq jours par semaine ; en parallèle, 14 lapines gestantes ont été exposées, dans les mêmes conditions, à une atmosphère non polluée (air ambiant filtré). **A GD28**, les femelles F0 ont été euthanasiées afin de prélever la muqueuse olfactive (MO), le bulbe olfactif (BO) et le cerveau sur les fœtus F1; ceci en vue de réaliser des expériences moléculaires, biochimiques et histologiques (encadrement en vert). Neuf femelles de chaque groupe ont été conservées pour donner naissance à des lapereaux de génération F1, dont le comportement olfactif a été exploré à **PND2** (astérisque en violet) ; puis, ils ont été élevés jusqu'à l'âge adulte. **A PND118 et à PND190**, certains animaux mâles ont été évalués dans un test de discrimination olfactive (astérisques en bleu). **A PND216**, des lapins adultes F1 issus de femelles contrôles et issus de femelles exposées ont été euthanasiés afin de prélever les structures olfactives et diverses structures cérébrales pour les expériences moléculaires, biochimiques et histologiques (encadrement en orange). Une partie des femelles adultes F1 a été mise en reproduction avec des mâles témoins issus de la lapinerie afin de produire une génération F2. Les lapines F1 gestantes ont été euthanasiées à **GD28** et les dissections des structures fœtales d'intérêt de la génération F2 réalisées dans les mêmes conditions que la génération F1. Adapté de Valentino et al, 2016a.

cerveau **sur les foetus F1**; ceci en vue de réaliser des expériences moléculaires, biochimiques et histologiques (Partie III) (Figure B3).

Neuf femelles de chaque groupe ont été conservées pour donner naissance à des lapereaux de génération F1 (n=62 contrôles, n=55 exposés), dont le comportement olfactif a été exploré au deuxième jour de vie postnatal (PND2, Partie II), puis, ils ont été élevés jusqu'à l'âge adulte.

Au moment du sevrage (PND35), une épidémie de diarrhées a décimé un grand nombre d'individus F1 des deux sexes et dans les deux groupes. Malgré les mesures de prise en charge des animaux qui ont été décidées, le taux de mortalité a été de 55% chez les témoins et 41% chez les exposés. Au final, seuls 72 lapereaux (tous sexe et groupes confondus) ont survécu et ont pu être retenus pour la suite de l'étude.

Peu après le sevrage (PND118) et à l'âge adulte (PND190), certains animaux mâles (n=7 contrôles et n=11 exposés)^[2] ont été évalués dans un test de discrimination olfactive de manière à établir la persistance, à l'âge adulte, d'éventuelles modifications précoces (PND2) de la perception olfactive (Partie II).

A PND216, des lapins adultes F1 issus de femelles contrôles (n=9 mâles et n=6 femelles) et issus de femelles exposées (n=10 mâles et n=8 femelles) ont été euthanasiés afin de prélever les structures olfactives et diverses structures cérébrales pour les expériences moléculaires, biochimiques et histologiques. Les tissus ont été traités de façon différentielle selon les besoins des explorations et analyses envisagées (Partie III) (Figure B3).

Une partie des femelles adultes F1 a été mise en reproduction avec des mâles témoins issus de la lapinerie afin de produire une génération F2. Les lapines F1 gestantes (n=6 contrôles et n=10 exposées) ont été euthanasiées à GD28 et les dissections des structures fœtales d'intérêt de la génération F2 réalisées dans les mêmes conditions que la génération F1 (Figure B3).

Les femelles gestantes F1 sélectionnées pour l'étude intergénérationnelle des effets de l'exposition aux PFD (n=3 contrôle et n=3 exposées), ne pouvant être gérées au niveau de la lapinerie du centre INRA de Jouy en Josas, ont été transférées dans les installations de l'animalerie centrale de la faculté de Médecine de l'Université de Lorraine pour procéder à l'étude de la génération F2.

Cet aléa expérimental a mené à la perte du groupe des femelles contrôles ; seuls les animaux F2 du bras exposé ont été testés au plan du comportement olfactif (PND2 et PND216), puis sur les structures olfactives et les cerveaux prélevés. Les résultats ne sont pas présentés ici.

[2]. Seuls les mâles ont été évalués dans ce test pour éviter l'influence du contexte hormonal propre aux femelles sur le comportement.

Partie II – Exploration comportementale de la fonction olfactive

<u>1</u>	Analyse de la sensibilité olfactive chez le lapereau	57
<u>2</u>	Analyse de la discrimination olfactive chez le lapin adulte	59

1. Analyse de la sensibilité olfactive chez le lapereau

A la naissance, l'olfaction joue un rôle déterminant dans la communication entre le nouveau-né et son environnement et plus particulièrement dans la communication mère-jeunes. En effet, les odeurs émises par la mère influencent le comportement de l'animal, qui utilisera ces stimuli pour s'adapter à l'environnement postnatal et survivre. En particulier, les odeurs présentes dans les fluides biologiques maternels, comme le liquide amniotique ou le lait, participent à la continuité chimique et facilitent la prise de la mamelle et l'initiation de la tétée chez la souris (Logan et al, 2012).

1.1. La réponse du lapereau à la phéromone mammaire

Chez le lapereau, la mère n'étant présente dans le nid que quelques minutes par jour, une mise en place rapide du comportement de tétée est primordiale pour sa survie. La production d'une phéromone mammaire (PM) au niveau de l'auréole a été décrite chez le lapin (Schaal et al, 2003) qui, présente dans le lait de la mère, déclenche de façon quasi-instantanée un comportement stéréotypé d'approche et de tétée chez des nouveau-nés qui la perçoivent (Coureaud et al, 2004) ; cette phéromone semble donc intervenir dans le guidage du lapereau vers les tétines et, *in fine*, dans le réflexe de tétée et de prise de lait.

Le lapin est donc une espèce très propice à l'étude des possibles perturbations du développement et du maintien des circuits neuronaux olfactifs. En effet, la reconnaissance de cette phéromone et la réponse qu'elle engendre chez le nouveau-né, plus le fait qu'une seule tétée par jour intervienne chez cette espèce, offrent la possibilité d'étudier la réactivité du lapereau à cette odeur et le développement des circuits olfactifs, et potentiellement de mettre en évidence des altérations de processus plastiques liés à une neurotoxicité (dans notre cas, induite par la fumée issue des moteurs diesel).

1.2. Test de reconnaissance à la phéromone mammaire 2MB2

Des lapereaux mâle et femelle (n = 62 témoins issus de 8 portées différentes et n = 55 exposés issus de 7 portées différentes) ont été étudiés au deuxième jour de développement post-natal (PND2) pour leur comportement en réponse à la présentation de la phéromone mammaire 2-Methyl-3-butyn-2-ol, (2MB2, catalogue # 136816; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) dans les mêmes conditions décrites par Coureaud et collaborateurs (2004,2010).

Le deuxième jour de vie postnatale (PND2) a été choisi pour ne pas perturber la phase périnatale quelle que peu critique pour la survie des animaux et pour mettre en évidence de possibles modulations de la réponse à la phéromone, en évitant qu'interviennent des facteurs confondants de plasticité liée à l'apprentissage.

Afin d'essayer de normaliser la valeur de ce stimulus olfactif, l'accès de la mère au nid a été bloqué le soir précédant l'expérience à 17h.

Le test a été réalisé le lendemain matin (8h). Il a consisté à imprégner les gants de latex avec un peu de matière du nid (litière, poils de la mère), puis de prendre individuellement chaque lapereau entre les mains afin de faire un petit « nid », en laissant sa tête en dehors pour qu'il puisse la bouger librement.

Lorsque l'animal a atteint un état d'immobilité relative (1 à 3 min après la prise dans les mains), l'extrémité d'un bâton de verre (longueur × diamètre: 15 × 0.3 cm) a été trempée dans une solution de 2MB2 (concentration finale : $5,10^{-8}$ g / ml dans l'eau), à une concentration choisie pour induire 60% de réponses positives chez des animaux témoins (Coureaud et al, 2004) et positionnée à 0,5 cm devant le museau de l'animal.

Le stimulus olfactif a été présenté pendant 10 secondes et la réponse de chaque animal a été enregistrée par caméra. Les films ont été ensuite visionnés par un expérimentateur en condition aveugle. Il a été considéré que l'animal répondait positivement s'il manifestait des mouvements de recherche, consistant en un balayage vigoureux horizontal et vertical de la tête et en un étirement du cou vers le stimulus odorant.

Une fois le test fini, l'animal a été immédiatement remis dans le nid avec le reste de la portée et identifié par un point. La totalité de la portée a été testée en moins de 15 minutes. La mère a été autorisée à accéder au nid dès la fin de l'expérience. Entre chaque animal, le bâton de verre a été rincé deux fois à l'éthanol absolu et à l'eau distillée, puis séché avec un tissu (KIMTECH SCIENCE®, KIMWIPES™).

Les résultats de ce test sont exprimés en pourcentage de réponses positives.

2. Analyse de la discrimination olfactive chez le lapin adulte

Afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications de la perception olfactive à l'âge adulte, les animaux contrôles et exposés ont été évalués dans un test de discrimination olfactive nommé « test de la boule à thé ».

2.1. Principe du test

Le test de la boule à thé est un test comportemental de sensibilité et de discrimination olfactive utilisé au laboratoire « Neuro-Biologie de l'Olfaction » (NBO) de l'INRA de Jouy en Josas afin de mesurer l'activité locomotrice et le comportement de reniflage en réponse à un stimulus chez le rat ([Badonnel et al, 2012](#) ; [Prud'homme et al, 2009](#)) et qui a été adapté pour le lapin.

Le but de ce test a été d'évaluer la fonction olfactive des lapins en mesurant 1) la capacité de l'animal à localiser et discriminer entre une boule métallique vide et une boule métallique remplie de foin (odeur alimentaire hédonique), et 2) l'effet du jeûne sur la discrimination et le temps passé au contact de chaque boule.

2.2. Procédure expérimentale

Des lapins mâles ont été testés juste après le sevrage (PND118 ; n=11 contrôles issus de 9 portées différentes et n=16 exposés issus de 7 portées différentes) et à l'âge adulte (PND190 ; n=7 contrôles issus de 7 portées différentes et n=10 exposés issus de 5 portées différentes).

Des séances d'habituation ont été réalisées pendant 3 jours comme suit : à 8H du matin, les lapins ont été sortis de leur pièce d'élevage pour être emmenés dans une salle « neutre » sans nourriture (pour être hors odeurs alimentaires) ; entre 10H et 12H, le lapin a été mis dans le dispositif d'expérimentation, une grande cage grillagée pour lapins (100 × 55 × 43cm) (où se trouvent les boules à thé vides suspendues à chaque extrémité) et a été laissé libre de se déplacer pendant 15 min, afin de s'adapter au nouvel environnement. Des brins de foin ont été alors donnés afin d'habituer les animaux à l'odeur et au goût du foin. Puis chaque animal a été replacé dans la pièce d'élevage avec sa nourriture.

Le jour du test (24H après la dernière phase d'habituation), selon le même calendrier horaire, chaque animal a été posé au centre du dispositif, où deux boules à thé étaient suspendues à chaque extrémité de la cage à une hauteur de 40 cm (l'une vide et l'autre remplie de foin). L'animal a été laissé libre de se déplacer pendant 10 min. Des observateurs ont noté le nombre de changements de côté (franchissement d'une ligne virtuelle séparant la cage en deux parties égales gauche et droite) comme indicateur de l'activité locomotrice générale, et le temps passé dans chacune des zones comme indicateur d'une préférence de place. Ils ont compté le nombre et le temps passé

Zone non-odorisée
ZNO

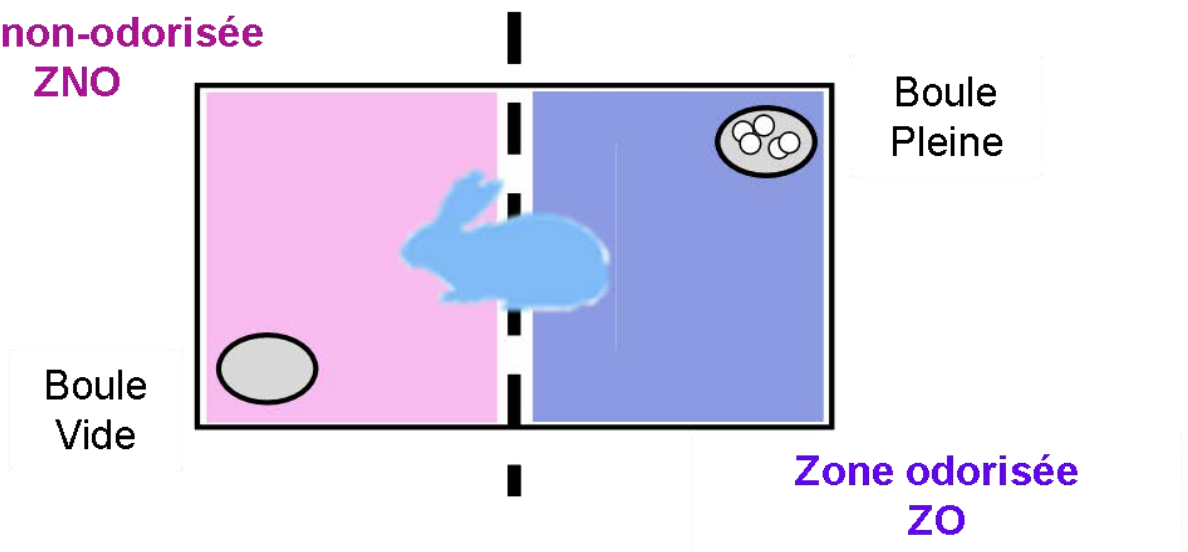


Figure B4 : Schéma du dispositif utilisé pour le test de la boule à thé. Le lapin a été mis dans le dispositif d'expérimentation, une grande cage grillagée pour lapins (100 × 55 × 43cm), où deux boules à thé étaient suspendues à chaque extrémité de la cage à une hauteur de 40 cm (l'une vide et l'autre remplie de foin). Des observateurs ont noté le nombre de changements de côté (franchissement d'une ligne virtuelle séparant la cage en deux parties égales gauche et droite, ligne **noire** en pointillées) comme indicateur de l'activité locomotrice générale, et le temps passé dans chacune des zones comme indicateur d'une préférence de place. Ils ont compté le nombre et le temps passé à renifler chacune des boules comme indicateurs de la motivation et de l'aptitude à discriminer une odeur hédonique (le foin). Une fois l'expérience finie, ils ont été remis dans la pièce d'élevage dans les conditions standard d'hébergement. Le soir même, la mangeoire a été retirée et les animaux ont été testés à nouveau dans les mêmes conditions le lendemain matin, après une mise à jeun de 16-18h. Dès le test terminé, ils ont été replacés dans la pièce d'élevage et nourris.

à renifler chacune des boules comme indicateurs de la motivation et de l'aptitude à discriminer une odeur hédonique (le foin).

Une fois l'expérience finie, ils ont été remis dans la pièce d'élevage dans les conditions standard d'hébergement. Une illustration schématique est présentée en Figure B4.

Le soir même, la mangeoire a été retirée et les animaux ont été testés à nouveau dans les mêmes conditions le lendemain matin, après une mise à jeun de 16-18h. Cette mise à jeun a pour but de motiver l'animal vis-à-vis du test de discrimination comme montré chez le rat ([Prud'homme et al., 2009](#)). Dès le test terminé, ils ont été replacés dans la pièce d'élevage et nourris.

Les animaux ont été testés par groupe de 3, par 3 expérimentateurs en condition aveugle. De plus, la position des boules était intervertie entre chaque série de lapins testés; ceci en vue de contrebalancer de possibles inconvénients techniques (une préférence de place, par exemple), ce qui aurait biaisé l'analyse ultérieure des résultats.

Partie III – Analyse structurale et ultrastructurale du système olfactif *via* la MET

<u>1</u>	Principe de la microscopie électronique à transmission	62
<u>2</u>	Préparation des tissus d'intérêt et réalisation des coupes	64

1. Principe de la microscopie électronique à transmission

La technique de microscopie électronique à transmission (ou MET) permet de passer outre la principale limitation de la microscopie optique, qui est sa résolution spatiale. En effet, la loi de Rayleigh énonce que les détails les plus petits que l'on peut observer sont proportionnels à la demi-longueur de l'onde lumineuse. Ainsi, puisque les plus courtes utilisées sont les ultraviolets (10-400 nm), la limite de résolution du microscope optique est environ de 0,25 μm . De ce fait, l'étude de l'architecture cellulaire fine n'est pas possible. Le principe de la microscopie électronique est donc d'utiliser une autre particule élémentaire, en l'occurrence l'électron, pour l'éclairage de l'objet. Ceci a deux avantages :

1. On peut obtenir des électrons dont la longueur d'onde associée est très faible (moins d'un angström, 10^{-10} m) ce qui permet d'atteindre une résolution de l'ordre du nanomètre.
2. Il est facile de les dévier grâce à un champ magnétique, du fait que les électrons sont chargés (ce qui peut être, grossièrement, l'équivalent d'une lentille).

L'échantillon à analyser est positionné sur une colonne optique électronique, constituée de tous les appareils nécessaires à la production, la focalisation et l'observation du faisceau d'électrons (elle regroupe donc le canon à électrons, les lentilles électromagnétiques et un écran fluorescent). Il est important de noter que l'ensemble de la colonne du MET est sous vide afin d'éviter toute interaction entre les électrons et les molécules de l'air.

Le faisceau d'électrons vient traverser l'échantillon en coupe très fine (50nm environ). Les électrons sont détectés après traversée de la coupe, comme pour le microscope optique (seul le principe de détection diffère).

Grâce à sa haute résolution, la microscopie électronique permet de visualiser une potentielle accumulation de nanoparticules dans les cellules, ainsi que la localisation de nanoparticules dans les organites cellulaires (Jong et al., 2010). En revanche, il convient de prendre en compte un certain nombre de limitations de cette technique pour l'évaluation de la biodistribution des nanoparticules.

Un des principaux inconvénients de cette technique concerne les dégâts produits en introduisant dans la chambre d'observation (sous vide) un échantillon de tissus biologiques qui comporte une grande quantité d'eau ; c'est la raison pour laquelle il est nécessaire de déshydrater l'échantillon avant de le placer sous vide. Ainsi, la préparation de l'échantillon est une étape primordiale afin de préserver la morphologie et la structure de l'échantillon, et afin que l'examen apporte des informations exploitables. De ce fait, il est essentiel de 1) préserver l'intégrité de l'échantillon, lequel ne doit subir aucune

transformation sous l'action du faisceau d'électrons et 2) traiter l'échantillon afin qu'il devienne transparent aux électrons.

En outre, cette technique ne permet pas d'évaluer de grandes coupes de tissus (par rapport à l'histologie standard), ce qui mène à ce que la biodistribution des nanoparticules dans un organe entier soit généralement estimée en évaluant un nombre limité de coupes du tissu.

De plus, la détection des nanoparticules par microscopie électronique nécessite la présence d'une quantité non négligeable de nanoparticules dans le tissu ([Jong et al., 2010](#); [Kempen et al., 2013](#)).

Ainsi, l'étude des possibles altérations anatomiques olfactives, ainsi que la mise en évidence des particules issues des fumées de moteur diesel, ont été réalisées en évaluant de façon simultanée, par MET, différentes populations neuronales au niveau des régions olfactives d'intérêt.

2. Préparation des tissus d'intérêt et réalisation des coupes

Ce travail a été réalisé au niveau de la plateforme MIMA2 de l'INRA de Jouy en Josas, sous la supervision du Dr. Christine Longin

2.1. Préparation des tissus d'intérêt

Des échantillons de MO et BO des fœtus GD28 F1 (N=2 mâles et N=2 femelles par condition et issus de deux portées différentes) ont été prélevés, puis sélectionnés aléatoirement pour l'étude en MET avant d'être fixés dans une solution de glutaraldéhyde 2% préparée dans un tampon de cacodylate de sodium (0.1M à pH 7.2) pendant une nuit à 4°C.

Les structures ont été coupées aléatoirement en petits morceaux afin de les faire entrer dans des paniers ce qui a permis de traiter tous les échantillons au même moment et de la même façon. Le protocole choisi a mené à l'utilisation d'un four micro-ondes afin d'automatiser les températures de la procédure.

Les échantillons ont été contrastés avec un mélange contenant 0.5% d'OTE (extrait de thé Oolong) pendant 20 min à 37°C, pour ensuite subir une post-fixation dans un mélange de tétr oxyde d'osmium (OsO_4) à 1% et de ferrocyanure de potassium à 1.5% dans le tampon de cacodylate de sodium pendant 20 min à 37°C. Les échantillons ont ensuite été déshydratés en utilisant une série croissante d'éthanol (30%, 50%, 70%, 90% 100% ; 5 min chacun, 37°C) et de l'acétone 100% (2 fois, 10 min, 37°C) ; puis, incluses dans un mélange de substitution acétone/Epon (v/v, 45 min, 45°C). Chaque échantillon a été transféré dans des gélules qui ont ensuite été remplies de résine Epon et introduites au micro-ondes pendant 60 min à 50°C. La polymérisation de la résine s'est poursuivie dans un four hermétique pendant 48H à 60°C. Les blocs contenant les échantillons ont été démoulés des gélules et stockés jusqu'à utilisation.

2.2. Réalisation des coupes semi-fines

Pour la réalisation des coupes semi-fines, les blocs ont été taillés en pyramide tronquée avec une surface de coupe en trapèze et placés sur le bras porte-objet du microtome, face à un couteau en diamant. Les divers réglages (parallélisme et distance par rapport au couteau, fenêtre de coupe, épaisseur des coupes...) ont été effectués systématiquement avant la réalisation des coupes et le godet du couteau rempli à l'eau distillée afin d'avoir une surface plane (surface à reflet gris brillant et opaque). Des coupes de 1µm ont été réalisées, récupérées à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée et déposées sur une goutte d'eau, préalablement posée sur une lame de verre dégraissée.

La goutte contenant les coupes a été séchée sur une platine chauffante (100°C environ). Les coupes ont été colorées à chaud avec un mélange de bleu de méthylène / Azure II filtré (v/v). Une fois l'apparition d'un liseret doré autour de la goutte de colorant,

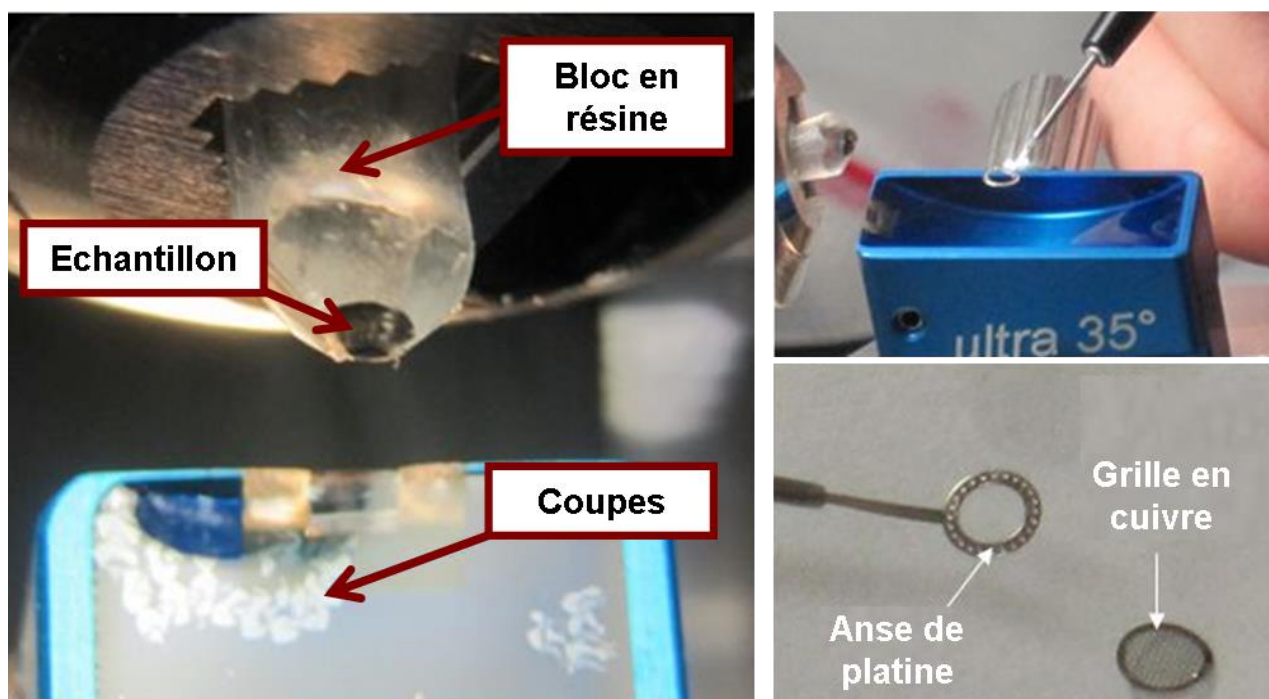


Figure B5 : Réalisation des coupes ultrafines. Les blocs en résine Epon ont été taillés en pyramide tronquée avec une surface de coupe en trapèze et placés sur le bras porte-objet du microtome, face à un couteau en diamant. Les divers réglages ont été effectués systématiquement avant la réalisation des coupes, et le godet du couteau rempli à l'eau distillée afin d'avoir une surface plane (surface à reflet gris brillant et opaque). Puis, des coupes ultrafines (75 nm épaisseur) ont été réalisées avec un ultramicrotome (Leica EM UC7). Les coupes ont été rassemblées sur la surface de l'eau remplissant le godet à l'aide d'un cil, et les coupes récupérées à l'aide d'une anse en platine, puis posées sur une grille en cuivre (préalablement nettoyée à l'éthanol absolu). Les grilles ont ensuite été séchées sur du papier filtre.

les coupes ont été rincées à l'eau distillée, puis à l'eau courante. Les coupes ont été séchées sur la platine, puis recouvertes avec une solution d'Epon et une lamelle de manière à protéger les coupes ainsi colorées. Elles ont été stockées à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à analyse.

Les coupes ont été examinées avec un microscope Olympus afin de mettre en évidence des possibles altérations structurales au niveau des échantillons d'intérêt.

2.3. Réalisation des coupes ultrafines

Après analyse des coupes semi-fines, nous avons repéré et localisé la section d'intérêt pour l'analyse ultrastructurale des échantillons.

Ainsi, les blocs ont été retaillés autour de la zone d'intérêt (toujours en forme de pyramide tronquée) afin d'avoir une surface de coupe de 1mm², avec des faces bien nettes et parallèles (Figure B5). Puis, des coupes ultrafines (75 nm épaisseur) ont été réalisées avec un ultramicrotome (Leica EM UC7). Les coupes ont été rassemblées sur la surface de l'eau remplissant le godet à l'aide d'un cil, et les coupes récupérées à l'aide d'une anse en platine « super-loop »®, puis posées sur une grille en cuivre (préalablement nettoyée à l'éthanol absolu). Les grilles ont ensuite été séchées sur du papier filtre (Figure B5).

Pour améliorer le contraste entre les différents organites cellulaires, les grilles ont été déposées sur une goutte de citrate de plomb pendant 3 min ^[3]. Les grilles ont été rincées successivement dans 2 solutions de soude (NaOH 1N et NaOH 0.1N) puis dans de l'eau distillée (25 allers-retours par grille).

Après un dernier rinçage à l'eau distillée (à l'aide d'une seringue), les grilles ont été séchées sur du papier filtre et stockées dans une boîte de Pétri (côté coupes vers le haut) jusqu'à analyse.

Les coupes ont été examinées avec un microscope électronique à transmission HITACHI HT7700 à 80KeV dont dispose la plateforme MIMA2 (<https://www6.jouy.inra.fr/mima2>).

[3]. on expose souvent l'échantillon à un produit contenant des atomes lourds (acétate d'uranyle et citrate de plomb), afin que ces derniers, en diffusant à la surface des différentes structures cellulaires, les rendent visibles.

Partie IV – Exploration de fonctions cérébrales et olfactives

<u>1</u>	Prélèvement des tissus d'intérêt	67
<u>2</u>	Quantification des taux de monoamines par HPLC	69
<u>3</u>	Analyse histologique des systèmes 5-HT et DA	71
<u>4</u>	Étude de la réponse apoptotique <i>via</i> la technique TUNEL	74
<u>5</u>	Analyse de l'activité cholinergique cérébrale	76
<u>6</u>	Analyse de l'activité métabolique neuronale <i>via</i> la CO	78
<u>7</u>	Exploitation statistique des données	80

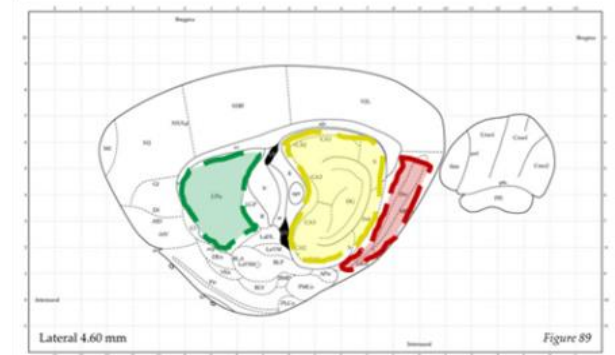
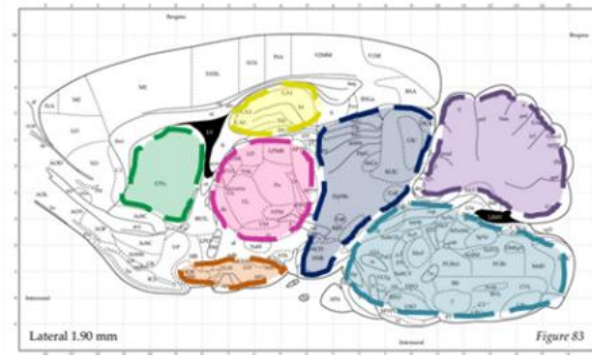
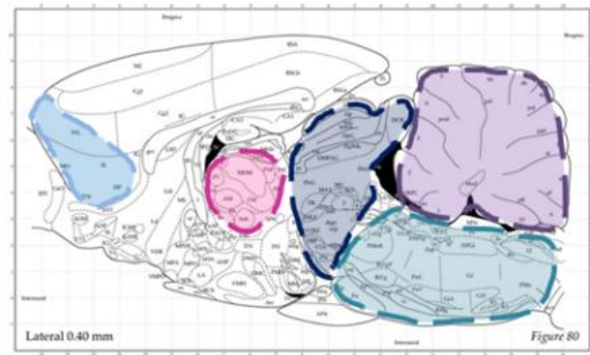


Figure B6 : Illustrations sur des figures issues de l'atlas de rat des différentes localisations de punches réalisés au cryostat. Nous avons prélevé le cortex préfrontal (bleu ciel), le striatum (vert), l'hypothalamus (orange), le thalamus (rose), l'hippocampe (jaune), le mésencéphale (bleu), le cortex temporal et entorhinal (rouge), le tronc cérébral (vert clair) et le cervelet (violet). Images issues de l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6ème édition, 2007).

1. Prélèvement des tissus d'intérêt

1.1. *Prélèvement des tissus olfactifs*

Les muqueuses olfactives (MO) et les bulbes olfactifs (BO) ont été prélevés chez les fœtus F1 à GD28, et les adultes F1 à PND216.

Certains échantillons de MO et BO ont été aléatoirement sélectionnés pour être congelés instantanément dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Les autres échantillons, dédiés à des études histologiques, ont été fixés immédiatement en PFA 4% à 4°C pendant 24 h ; puis, ces structures ont été cryo-protégées avec une solution de saccharose 30% à 4°C pendant 3 jours. Les tissus ont ensuite été incorporés dans du tissue-TEK et stockés à -80°C. Des coupes sériées des BO (16 µm) ont été réalisées, montées sur lame numérotées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour chaque étude immunohistochimique effectuée, des coupes ont été sélectionnées sur la base de leur numérotation pour être représentatives des différentes zones tissulaires.

En ce qui concerne les adultes F1, aucun tissu n'a été fixé au PFA lors du prélèvement. De ce fait, l'étude histologique n'a pas été réalisée sur ce stade.

1.2. *Prélèvement des tissus centraux*

Les cerveaux ont été prélevés chez les fœtus F1 et F2 à GD28, et les adultes F1 à PND216.

1.2.1. *Prélèvement des tissus centraux fœtaux*

Concernant ces tissus cérébraux des fœtus GD28 F1 aléatoirement sélectionnés pour être congelés instantanément dans l'azote liquide, les cerveaux ont été prélevés dans des conditions ne permettant pas de les microdisséquer immédiatement, du fait de la cadence de l'abattage et du personnel disponible. Les cerveaux ont été congelés en demi-hémisphères dans des tubes eppendorf. De ce fait, les hémisphères ont pris la forme de leur récipient.

Afin de passer outre cette difficulté, et récupérer des sous-régions cérébrales des individus GD28 de la génération F1, un protocole reproductible de microdissection sur tissu congelé a été mis en place. Ce dernier a consisté à fixer au cryostat le demi-hémisphère de cerveau et faire des coupes sagittales de 20 µm d'épaisseur en faisant des colorations au crésyl violet pour comparaison avec les images colorées de la même manière de l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007) jusqu'à identification de la zone d'intérêt à prélever.

Une fois la structure d'intérêt repérée, des microdissections ont été réalisées directement sur le tissu à l'aide d'un scalpel jetable.

Pour cette étude, neuf structures cérébrales ont pu être sélectionnées, à savoir : le cortex préfrontal (PFC), le striatum (caudé putamen, Str), l'hypothalamus (Ho), le thalamus (Th), l'hippocampe (Hp), le cortex temporal et entorhinal (CxT), le mésencéphale (Mes), le tronc cérébral (Tc) et le cervelet (Cb) (Figure B6). Les sous-structures ont été placées dans des tubes eppendorf de 1,5 ml stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Concernant les tissus cérébraux des fœtus GD28 F1 utilisés pour les études histologiques, les cerveaux entiers ont été récupérés et congelés dans une solution de 2-méthylbutane refroidi à -34°C dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Des coupes sériées de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées dans le plan frontal au cryostat (Bright OTF 5000, Allemagne) à -20°C, sur des lames préalablement gélatinées. Deux coupes adjacentes ont été déposées sur une même lame ; la 3^{ème} coupe a été éliminée. Six séries de lames ont été réalisées pour chaque cerveau (Figure B6).

1.2.2. Prélèvement des tissus centraux adultes

En ce qui concerne les tissus cérébraux des adultes F1, les hémisphères gauches ont été disséqués et cinq structures d'intérêt [cortex préfrontal (PFC), amygdale (Amy), hypothalamus (Ho), hippocampe (Hp) et cervelet (Cb)] prélevées à froid sous loupe binoculaire immédiatement après la décapitation de l'animal. En l'absence d'un atlas de cerveau de lapin disponible, les structures anatomiques ont été récupérées selon l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007). Chaque structure a été congelée instantanément dans de l'azote liquide et gardée à -80°C pour les analyses ultérieures. Le reste de l'hémisphère a été congelé dans des papillotes en aluminium et gardé à -80°C.

Concernant les échantillons utilisés pour des études histologiques, les hémisphères droits des adultes F1 ont été récupérés et congelés dans une solution de 2-méthylbutane refroidi à l'azote liquide, puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

Il a été décidé d'effectuer des blocs de coupe pour permettre l'exploration de l'ensemble des territoires cérébraux depuis le tronc cérébral jusqu'au cortex préfrontal (Figure B7). 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, et déposées 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 éliminées entre chaque bloc. Toutes les coupes ont été stockées à -80°C jusqu'à la réalisation du marquage d'intérêt. Une série a été utilisée pour la réalisation d'un marquage particulier (Figure B7).

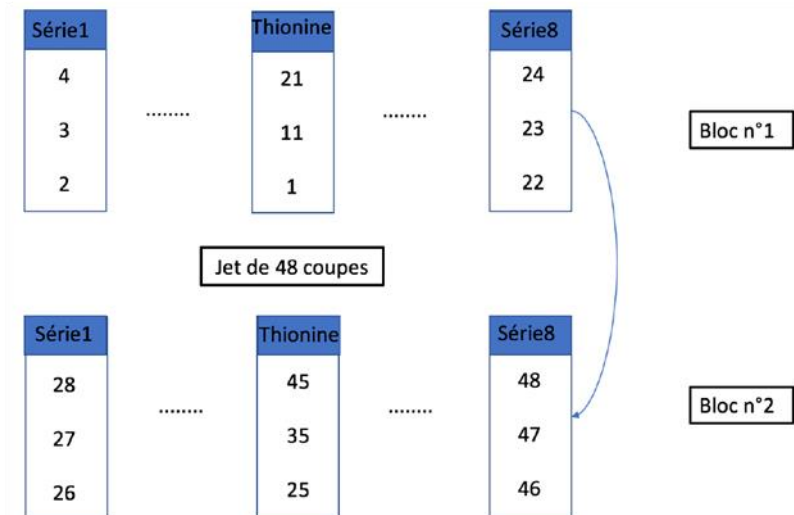
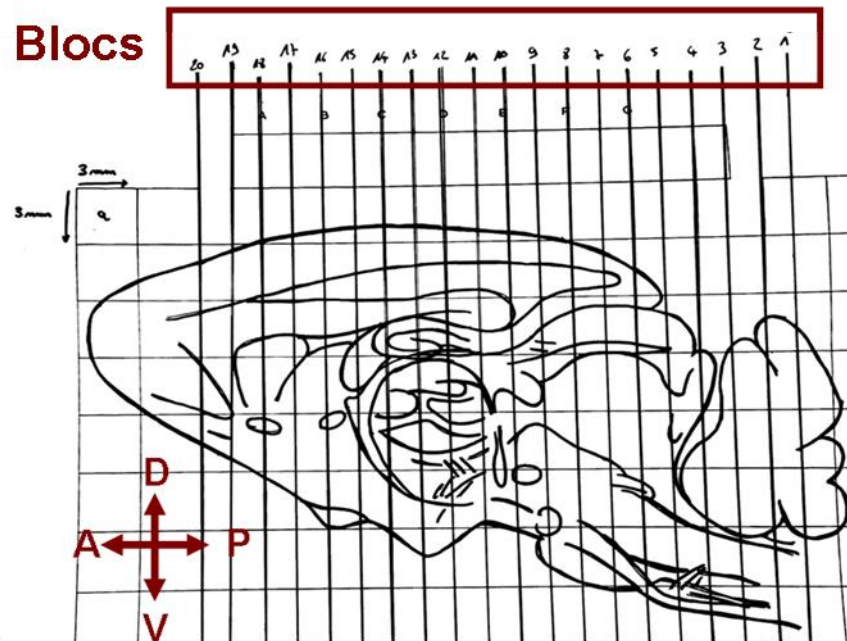


Figure B7 : Représentation du plan de coupe des cerveaux de lapins adultes. **A gauche**, schéma d'un cerveau de lapin adulte (en coupe sagittale) sur lequel on peut voir la répartition des différents blocs de coupes. Chaque trait représente un bloc de 24 coupes successives. **A droite**, Représentation de la position des coupes de cerveau. 3 coupes successives ont été mises sur la même lames 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 divers séries afin d'avoir un repère anatomique.

2. Quantification des taux de monoamines par HPLC

L'étude des possibles répercussions des fonctions olfactives et cérébrales a été recherchée *via* le dosage de monoamines, ces dernières étant impliquées dans la modulation de diverses réponses neuronales. Ainsi, il a été décidé de réaliser une évaluation simultanée des niveaux de divers monoamines [sérotonine (5-HT), dopamine (DA) et noradrénaline (NA)] et de leurs métabolites au niveau des régions d'intérêt, selon une méthode HPLC couplée à une détection fluorimétrique et électrochimique (coulométrie).

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec le Pr. Jacques Callebert du Servie de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Hôpital Lariboisière à Paris

2.1. Principe de l'HPLC

La chromatographie liquide à haute performance, ou HPLC (pour High Performance Liquid Chromatography), est une méthode de séparation et de purification d'un ou plusieurs composés (les solutés) présents dans un échantillon en vue de les identifier et de les quantifier en utilisant un dispositif sous haute pression. Il est constitué classiquement de deux phases : une phase stationnaire, composée d'une colonne de séparation (de diamètre variable), et une phase mobile, composée d'une solution de solvants poussée à l'aide d'une pompe. Deux combinaisons de phases peuvent être utilisées : une en phase normale et une en phase inverse. En phase normale, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire, tandis qu'en phase inverse, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire. Le plus souvent, c'est en phase inverse que sont faites les séparations. La colonne contenant la phase stationnaire est également composée d'un volume mort qui est traversé par la phase mobile. La colonne est souvent constituée de parois de silice à laquelle sont accrochées des chaînes de carbone, apportant ses propriétés apolaires à la colonne. La phase mobile polaire est constituée de solvants organiques polaires dissous dans un tampon dont le pH est déterminé afin d'être favorable à la bonne séparation des constituants d'un échantillon.

L'échantillon à analyser est injecté dans la phase mobile et propulsé à haute pression en parcourant tout le système chromatographique. Les composés se trouvent alors répartis le long de la colonne selon leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile, et sont élués avec des temps de rétention et des concentrations variables propres à leurs caractéristiques chimiques.

Par exemple, si la noradrénaline possède une affinité moins importante pour la phase stationnaire que la dopamine, elle sortira en premier de la colonne. Les différents composés sont ensuite dosés dans le liquide sortant de la colonne par la méthode appropriée.

2.2. Dosage des monoamines

Préalablement, les tissus ont été broyés dans de l'acide perchlorique (HClO_4 , 0,2 M) et le broyat a été centrifugé à 22000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été collecté et filtré à travers une membrane de 10k Da (Nanosep, Pall) par centrifugation à 7000 g. Puis, 20 μL de chaque aliquot ont été injectés dans un système HPLC consistant en une pompe associée à un injecteur automatique (Agilent, 1100), une colonne en phase inverse (3,5 μm , 1504,6 mm; Zorbax SB C18, Agilent Technologies) et un détecteur coulométrique (Coulochem III, ESA Biosciences), avec une cellule analytique (ESA 5011, ThermoFisher industries). La première électrode a été fixée à -100 mV et la deuxième électrode à +300 mV. Le gain du détecteur a été fixé à 50 nA. Le signal de la deuxième électrode a été connecté à une Chemstation pour HPLC (Kema NV, Arnhem, Pays Bas). La composition de la phase mobile était constituée de NaH_2PO_4 50 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, sulfate d'octyl-sodium 0,65 mM et méthanol à 14% (v/v), à pH 3,5. Le débit a été fixé à 1 ml / min.

Dans cette étude, la quantification des catécholamines (dopamine et noradrénaline), ainsi que les métabolites de la sérotonine et des catécholamines, a été réalisée par coulométrie ; le tryptophane et la sérotonine ont été détectés et quantifiés par fluorimétrie selon le protocole de détection décrit par Gamache et collaborateurs (1993) et Kema et collaborateurs (1993).

L'analyse, l'identification et la quantification des pics ont été totalement automatisés. La quantification a été réalisée sur la base de l'étalon injecté dans chaque HPLC, dans la même gamme de concentration que les échantillons expérimentaux. Les résultats ont été ensuite exprimés en femtomoles/mg de tissu frais.

Des rapports entre la monoamine d'intérêt et son métabolite principal ont été réalisés afin de lier les taux de métabolites à la transmission d'intérêt (dopaminergique, sérotoninergique, noradrénergique). Ce ratio est utilisé en tant qu'estimateur de l'activité monoaminergique d'intérêt, permettant d'avoir des informations sur le taux catabolique ou sur l'activité d'une enzyme particulière.

3. Analyse histologique des systèmes 5-HT et DA

L'étude des possibles altérations neurochimiques induites par l'exposition aux PFD a été complétée *via* l'analyse du marquage immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme limitante de la production des catécholamines) et de la tryptophane hydroxylase (TrpH, enzyme limitante de la production de sérotonine).

3.1. Procédure de marquage et quantification des tissus bulbaires

3.1.1. Marquage des tissus

Les coupes de BO d'intérêt ont été sorties du congélateur -80°C (voir B§1.2.1) et séchées à température ambiante pendant 20 minutes. L'activité de la peroxydase endogène a été ensuite inhibée avec de l'eau oxygénée (H₂O₂, 0,3% en PBS) pendant 30 min.

Les coupes ont ensuite été bloquées avec une solution de sérum de cheval 10% (NHS H0146, Sigma, St. Louis, MO) additionné avec de la BSA 1% pendant 30 min en PBS_{1X}, puis incubées pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps monoclonal anti-TH de souris (catalogue n ° T1299; Sigma, St. Louis, MO ; 1/ 5000 dans du Triton X₁₀₀ 0,3% en PBS_{1X}), ou de l'anticorps monoclonal anti-TrpH de souris (catalogue #T0678; Sigma, St. Louis, MO ; 1/ 2000 dans du Triton X₁₀₀ 0,3% en PBS_{1X}). Comme contrôle interne de vérification de la spécificité du marquage, des coupes de BO ont été incubées sans l'anticorps primaire.

Après 3 rinçages en PBS_{1X}, les échantillons ont été incubés pendant 30 min à température ambiante avec une IgG anti-souris biotinylée, produite chez le cheval et utilisée comme anticorps secondaire (kit Vectastain Elite ABC, PK-6102, Vector laboratories, Burlingame, USA); puis, un complexe avidine-biotine-peroxydase (kit Vectastain Elite ABC, PK- 6102, Vector laboratories, Burlingame, États-Unis) a été utilisé pendant 30 min, conformément aux instructions du fournisseur.

La révélation du signal a été faite en utilisant un kit de substrat de 3', 3-diaminobenzidine (DAB, SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, USA) pendant 10 min, ce qui a conduit à l'apparition d'un précipité marron insoluble en réaction du substrat avec la peroxydase. La réaction a été arrêtée par rinçage avec de l'eau distillée. Les coupes ont ensuite été séchées et les tissus recouverts avec une lamelle et de l'Eukitt (03989, Sigma- Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) de manière à protéger les coupes ainsi marquées avant observation au microscope.

3.1.2. Semi-quantification de l'immunomarquage tissulaire de la TH

Les coupes ont été examinées à l'aide d'un microscope optique (Nikon Eclipse Ni-U) à deux grossissements (x4 et x40, Nikon France, Champigny-sur-Marne, France) et quantifiées à l'aide du logiciel NIS-Elements Br (Nikon). La quantification a été faite à

l'aveugle. Le protocole immunohistochimique à la TH réalisé au niveau du BO, a permis de mettre en évidence les cellules périglomérulaires synthétisant la dopamine exclusivement au niveau de la zone glomérulaire (zone d'intérêt).

Concernant la TrpH, le marquage s'est avéré faible et non-spécifique. L'analyse quantitative n'a donc pas pu être réalisée.

Le nombre de cellules périglomérulaires marquées à la TH (TH⁺) a été quantifié sur 2 coupes non adjacentes par fœtus. Après application d'un seuil optimal ([30; 170]) pour exclure le marquage non-spécifique et le bruit de fond, la quantification des cellules TH⁺ a été entièrement automatisée. Le nombre de cellules TH⁺ a ensuite été normalisé à la taille de la zone sélectionnée (ROI). Deux ROI indépendantes par section ont été analysées (quatre mesures ont donc été réalisées par animal).

Pour l'analyse de la densité optique moyenne du marquage TH des cellules TH⁺, le cytoplasme de ces dernières a été sélectionné comme ROI et son intensité a été calculée par densitométrie optique sur des sections de BO en utilisant l'objectif x40.

La densité optique de 20 cellules TH⁺ par animal a été quantifiée de manière aléatoire et a été normalisée par rapport à la surface de chaque ROI cytoplasmique sélectionnée. Il a été décidé de normaliser la densité optique de chaque cellule en fonction de la densité optique moyenne obtenue sur 20 cytoplasmes de cellules TH⁺ d'animaux issus de lapines contrôles du même jour expérimental; cette densité a été exprimée en pourcentage de densité optique moyenne.

3.2. Procédure de marquage et semi-quantification des voies centrales

3.2.1. Marquage des tissus

Les coupes d'intérêt ont été sorties du congélateur -80°C (voir B§1.2.1) et séchées à température ambiante pendant 20 minutes, pour être ensuite fixées avec du paraformaldehyde (PFA) 4% en PBS pendant 30 min. Puis, la procédure de marquage a été réalisée dans les mêmes conditions que sur les tissus bulbaires (voir B§3.1.1).

La révélation du signal a été réalisée dans les mêmes conditions et en utilisant le même kit de substrat de 3', 3'-diaminobenzidine (DAB, SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, USA) mais pendant 3 min.

Les marquages à la TH ont été réalisés au niveau du mésencéphale (substance noire et aire tegmentale ventrale), du striatum et du cortex préfrontal (Figure B8). Les marquages à la TrpH ont concerné le noyau du raphé (Figure B9).

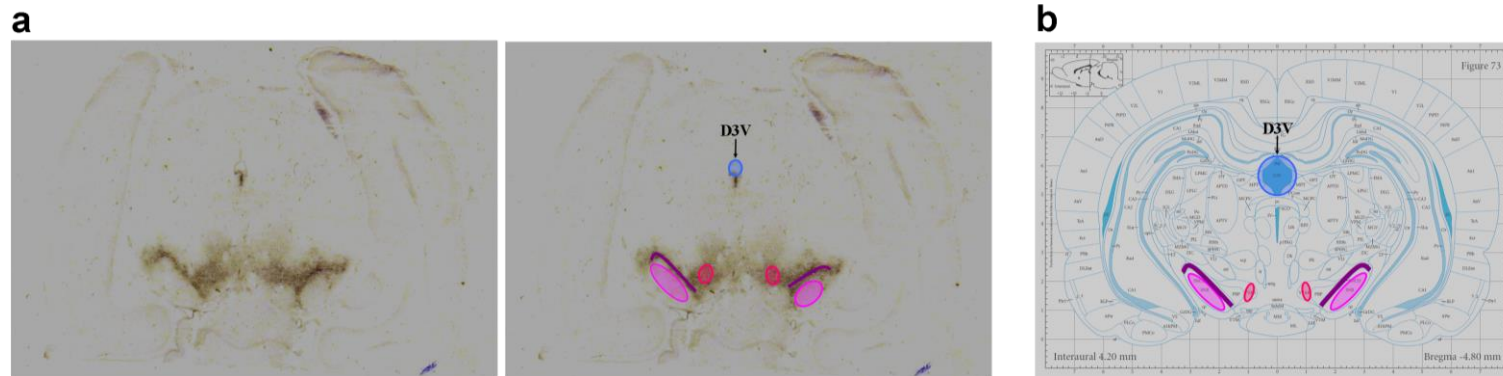


Figure B8 : Analyse du niveau de TH⁺ au niveau de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale des fœtus F1. a. Photographie du marquage TH⁺ au niveau du mésencéphale (en haut) et zones sélectionnées pour l'analyse de la substance noire (SN) et de l'aire tegmentale ventrale (VTA) (en bas). b. Image issue de l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007) avec la représentation des zones sélectionnées. **D3V** : Troisième ventricule, partie dorsale ; **SNc** : Substance noire pars compacta ; **SNr** : Substance noire pars compacta ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale.

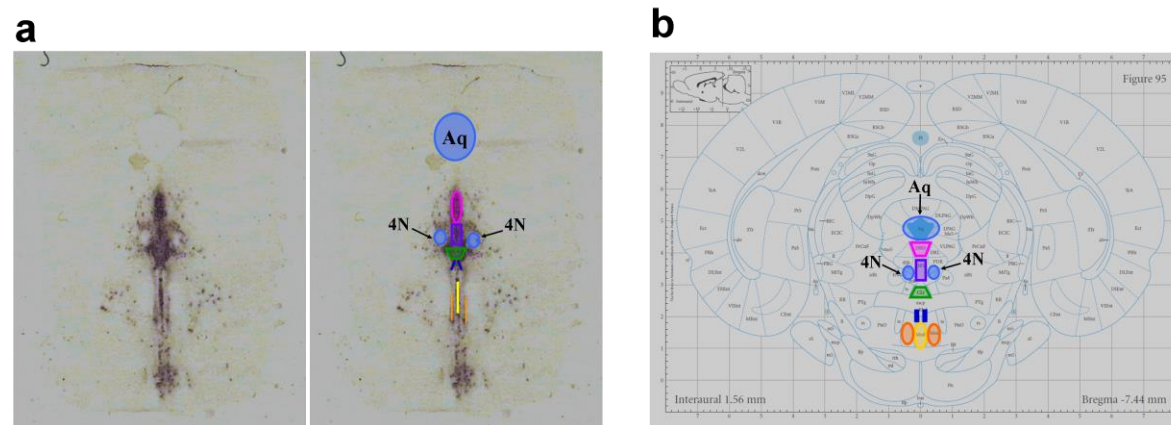


Figure B9 : Analyse du niveau de TrpH⁺ au sein des noyaux du Raphé des fœtus F1. a. Photographie du marquage TrpH⁺ au niveau du tronc cérébral (à gauche) et zones sélectionnées pour l'analyse des noyaux du Raphé (à droite). b. Image issue de l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007) avec la représentation des zones sélectionnées. **Aq** : Aqueduc ; **4N** : Nerf trochléaire ; **DRD** : Noyau Dorsal du Raphé ; **DRV** : Noyau ventral du Raphé ; **CLi** : Noyau du Raphé caudal linéaire ; **Rbd** : Noyau rhabdoïde ; **MnR** : Noyau du Raphé médian ; **PMnR** : Noyau du Raphé paramédian.

3.2.2. Semi-quantification de l'intensité du marquage *des tissus*

L'intensité des marquages TH⁺ et TrpH⁺ a été mesurée par densitométrie numérisée avec un analyseur d'images (Biocom, Les Ulis, France). La densité optique des régions d'intérêt a été mesurée sur au moins trois coupes consécutives. Le marquage non spécifique moyen (mesuré sur chaque coupe dans une région sans marquage TH⁺ ou TrpH⁺) a été soustrait du marquage total.

4. Étude de la réponse apoptotique *via* la technique TUNEL

L'étude des possibles altérations de la réponse cellulaire du système olfactif chez les foetus GD28 F1 a été recherchée au travers de la mesure de la fragmentation de l'ADN, révélatrice d'un processus apoptotique. En effet, l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur élimination en réponse à un signal délétère pour leur survie. Lors du processus d'apoptose, l'ADN est hydrolysé de façon très spécifique en fragments, ce qui cause une distribution très caractéristique des fragments d'ADN en « échelle » et l'apparition de coupures franches de l'ADN, phénomène qui peut être mis en évidence *via* la technique TUNEL.

4.1. Principe du TUNEL

La méthode TUNEL (pour Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) est une méthode de détection de la fragmentation de l'ADN apoptotique, largement utilisée pour identifier et quantifier les cellules en apoptose, ou pour détecter une cassure excessive de l'ADN dans des cellules individuelles. Le test repose sur l'utilisation de la désoxynucléotidyl transférase terminale (TdT), une enzyme qui catalyse la fixation des désoxynucléotides marqués avec un fluorochrome ou un autre marqueur, aux extrémités 3'-hydroxyles des cassures double brin de l'ADN. Il peut, cependant, également identifier les cellules dont l'ADN est endommagé par d'autres processus que lors de l'apoptose.

4.2. Procédure de marquage et analyse des tissus bulbaires

4.2.1. Marquage des tissus

Les cellules apoptotiques ont été mises en évidence à l'aide du kit DeadEnd Fluorometric TUNEL system (Promega™ G3250, Fischer Scientific) lequel a été utilisé conformément aux instructions du fournisseur.

Brièvement, les coupes de BO d'intérêt ont été sorties du congélateur -80°C (B§1.2.1) et ont été séchées à température ambiante pendant 20 minutes, pour être incubées dans un bain de NaCl 0,85%, puis rincées dans un bain de PBS_{1X} (5 min). Elles ont été fixées au PFA 4% (15 min), lavées au PBS_{1X} (3 fois, 5 min) et perméabilisées avec la Protéinase K (Promega™ G3250, Fischer Scientific ; 1/500 final en PBS_{1X}). Après rinçage (PBS_{1X} ; 5 min), les tissus ont été post-fixés au PFA 4% (15 min), puis incubés dans le tampon d'équilibration (10 min). Les échantillons ont été incubés avec un tampon d'incubation (composé de 44µl de tampon d'équilibration, 5µl de nucléotides et 1µl d'enzyme TdT), lequel a été déposé sur chaque coupe (1h à 37°C en chambre humide). Comme contrôle interne de spécificité, des coupes de BO on été incubées avec le tampon d'incubation dépourvu de nucléotides.

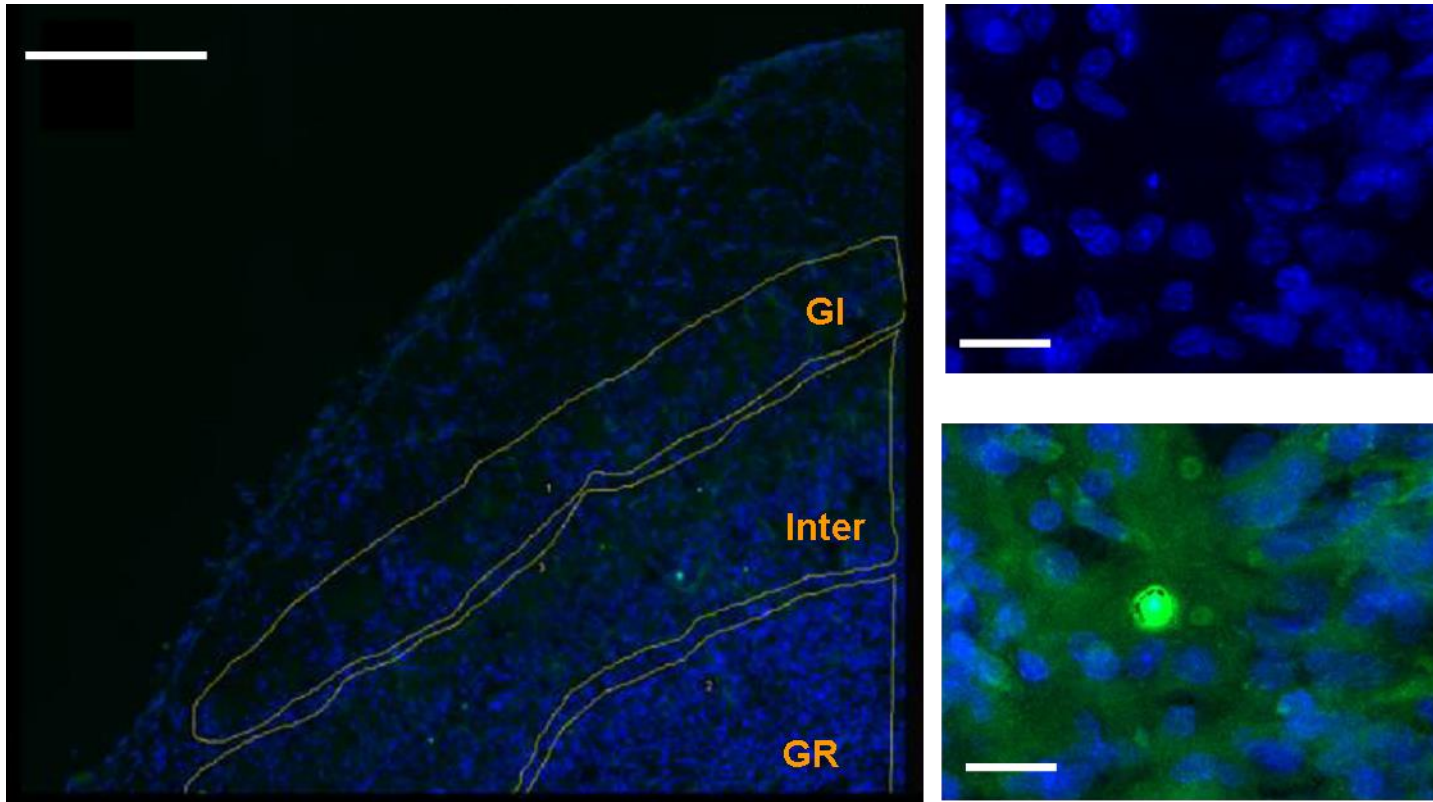


Figure B10 : Analyse des bulbes olfactifs marqués au TUNEL. Les coupes ont été numérisées à la plateforme @BRIDGE de l'INRA de Jouy en Josas, via le scanner de lames à fluorescence (Pannoramic SCAN, 3DHISTECH). Une fois les lames scannées, les images ont été importées sur Pannoramic Viewer. Trois à quatre photos ont été prises au hasard, sur une coupe par lame (soit, quatre lames par échantillons), pour être analysées à l'aide du logiciel ImageJ. **A gauche** est présentée une image de bulbe olfactif avec la délimitation des régions d'intérêt (ROI, en **jaune**), à savoir, une zone glomérulaire (**GI**), une zone granulaire (**Gr**) et une zone intermédiaire (**Inter**). Après cerclage manuel des différentes ROI, l'aire et le pourcentage d'aire marquée au Hoechst ont été calculés en utilisant l'algorithme le plus adapté pour ce type de marquage. Le nombre de cellules marquées au TUNEL a été compté à l'oeil nu. Une cellule était considérée comme positive si et seulement si le marquage d'intérêt TUNEL et le marquage au Hoechst étaient superposés (**à droite**). Echelle : à gauche : 250µm ; à droite : 20µm.

La réaction a été arrêtée en plongeant les lames dans du tampon sodium-citrate (SSC_{2X}, 15 min) puis rincées (PBS_{1X}, 3 fois, 5 min). Enfin, les noyaux ont été marqués grâce au Hoechst (1/1000 final ; 10 min) et les lamelles rincées (PBS_{1X}, 3 fois, 5 min). Les échantillons ont été séchés et recouverts avec une lamelle et de l'Eukitt (03989, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) de manière à protéger les coupes avant observation.

4.2.2. Analyse des tissus marqués au TUNEL

Les coupes ont été numérisées à la plateforme @BRIDGE de l'INRA de Jouy en Josas, *via* le scanner de lames à fluorescence (Pannoramic SCAN, 3DHISTECH). Une fois les lames scannées, les images ont été importées sur Pannoramic Viewer. Trois à quatre photos ont été prises au hasard, sur une coupe par lame (soit, quatre lames par échantillons), pour être analysées à l'aide du logiciel ImageJ.

La délimitation des régions d'intérêt (ROI), a été effectuée sur l'image marquée au Hoeschst. Les coupes ont été divisées en trois zones d'intérêt : une zone granulaire (Gr), région médiane et riche en cellules, une zone glomérulaire (Gl), présentant les cellules glomérulaires, et une zone intermédiaire (Inter), région intermédiaire entre les zones Gr et Gl (Figure B10).

L'aire de la zone (ROI) et le pourcentage d'aire marquée au Hoechst (%Hoeschst) ont été calculés en utilisant l'algorithme « triangle » sur ImageJ, ce qui a permis ensuite d'avoir une estimation de la densité cellulaire (soit %Hoeschst/ROI).

Le nombre de cellules marquées au TUNEL (TUNEL⁺) a été compté manuellement. Une cellule a été considérée comme positive si et seulement si le marquage TUNEL et le marquage au Hoechst étaient superposés. Ce comptage a été effectué sur 2 coupes non adjacentes par fœtus. Le nombre de cellules TUNEL⁺ a ensuite été normalisé à la taille des zones sélectionnées (TUNEL⁺/ROI) et au nombre de cellules Hoeschst (Figure B10). Au moins deux ROI équivalentes indépendantes par section ont été analysées (soit, au moins quatre mesures réalisées par animal).

5. Analyse 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).

5.1. Principe de l'analyse histochimique *via* l'AChE

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur qui joue un rôle crucial dans les mécanismes d'éveil et de plasticité cérébrales, et qui 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). L'acétylcholine étant métabolisée en acétyl-CoA et en choline par l'acétylcholinestérase (AChE) selon un métabolisme limitant, la distribution de l'AChE s'avère étroitement associée à celle de l'acétylcholine; l'activité de cette enzyme peut ainsi être considérée comme un marqueur valide et fiable pour l'étude de l'intégrité des neurones cholinergiques et de la distribution et la densité des terminaisons cholinergiques dans diverses régions cérébrales (Gordon et Finch, 1984; Mesulam et Geula, 1988).

5.2. Analyse des tissus marqués à l'AChE

5.2.1. Marquage des tissus

Tous les produits chimiques nécessaires à la technique de marquage proviennent 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 h, 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 de l'HCl.

La réaction a été arrêtée par rinçage des lames dans l'eau distillée pendant 1 min. 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 min. 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%,

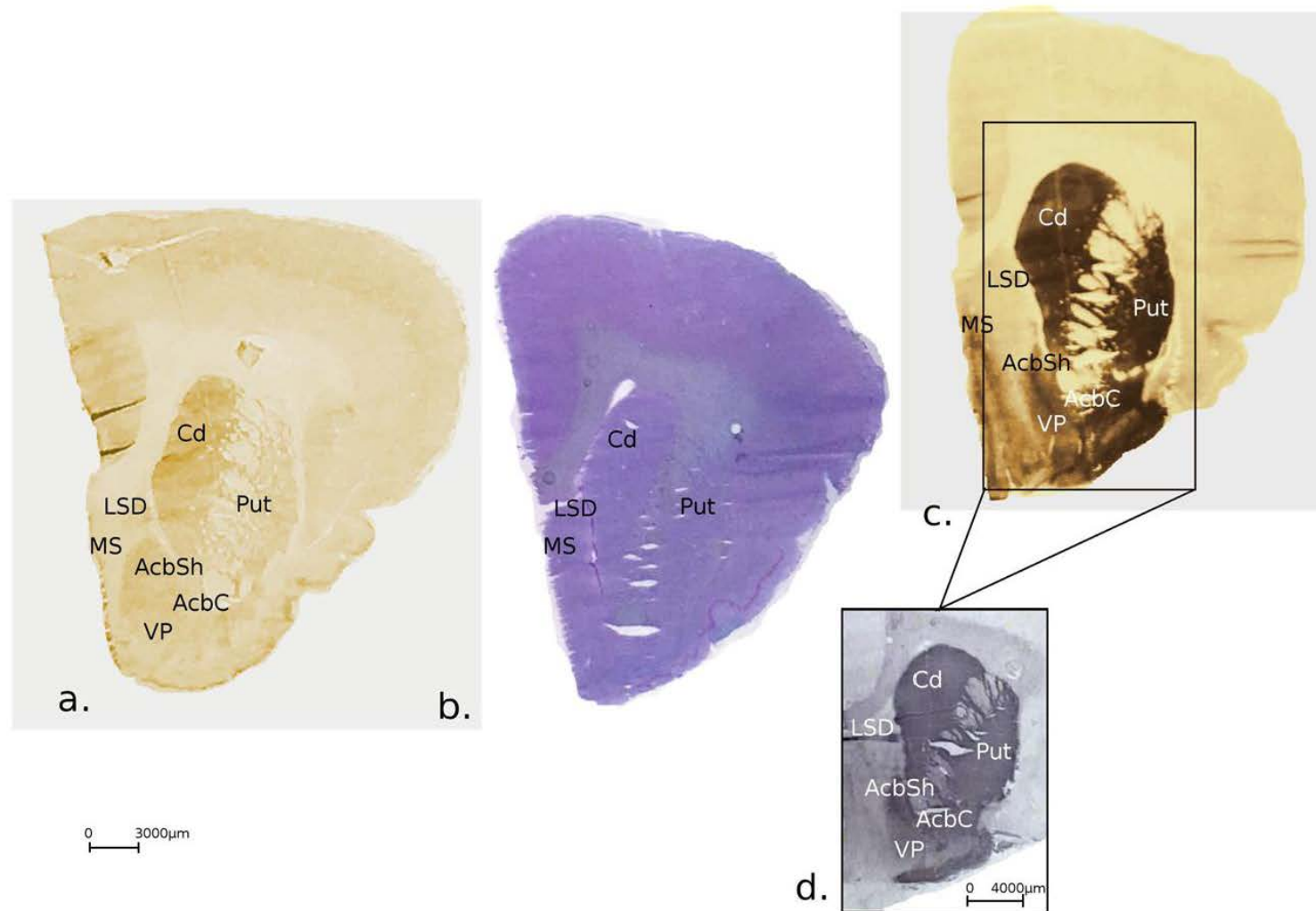


Figure B11 : Photographies de coupes de cerveau de lapin adulte F1 au niveau du striatum. a. Marquage à la cytochrome oxydase (CO). **b.** Marquage à la thionine. **c.** Marquage à l'acétylcholinestérase (AChE). **d.** Marquage à la tyrosine oxydase (TH). Image issue de l'atlas de l'encéphale de lapin, atlas réalisé par Grégoire Mencarelli, Benoît Olivier et Estefanía Bernal Meléndez sous la direction du Dr. Pascaline Bouillaud et du Dr. Henri Schroeder.

3 × 3 min, puis 2 × 5 min), et nettoyées au toluène (2 × 5 min). Les coupes ont été séchées et recouvertes avec une lamelle et de l'Eukitt de manière à les protéger.

5.2.2. 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 rats adultes. L'activité enzymatique des homogénats cérébraux a été mesurée biochimiquement par spectrophotométrie selon le protocole décrit par Ellman et collaborateurs, et modifié par Dumont et collaborateurs (Ellman et al, 1961 ; Dumont et al, 2006). Brièvement, 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 thio-choline, 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 (foétales ou adultes) (Figure B11) 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.

6. Analyse de l'activité métabolique neuronale via la CO

L'étude des possibles altérations neuronales liées à l'exposition aux PFD a été réalisée *via* l'analyse histochimique de l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase (CO), qui est un marqueur de la capacité énergétique des neurones ainsi que de leur niveau d'activité.

6.1. Principe de l'analyse histochimique *via* la cytochrome oxydase

La cytochrome oxydase (CO) 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 anaérobies. L'activité neuronale dépend donc avant tout de la consommation du glucose et du métabolisme oxydatif pour permettant l'apport d'énergie à la cellule et répondre à l'accroissement des besoins énergétiques lors de la stimulation des réseaux neuronaux.

Wong-Riley et collaborateurs (1989) ont ainsi montré que l'activité de la CO peut être considérée comme un indice valide et fiable de l'activité métabolique du neurone du fait que l'activité de cette enzyme est proportionnellement liée aux besoins énergétiques de la cellule.

Il a donc été décidé d'utiliser, pour la première fois chez le lapin, cette technique de marquage et de quantification de l'activité régionale de la CO par histochimie développée au laboratoire sur la base du protocole de Wong-Riley (1989) pour le cerveau de la souris et du rat. Il est à noter que cette technique a déjà permis de mettre en évidence des variations localisées de l'activité cérébrale de la CO 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).

6.2. Analyse des tissus d'intérêt marqués à la CO

6.2.1. Marquage des tissus

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

Les coupes ont été incubées en même temps que des lames « standard » à l'obscurité et à 37°C, pendant 90 minutes, dans une solution contenant 0,04 g de cytochrome c extrait 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 des lames dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4, avec 10% de saccharose (p/v) pendant 5 minutes.

A la suite de la révélation de l'activité de la CO, le tissu a été fixé dans du formol tamponné (formaldéhyde à 4% (v/v)) à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, les coupes 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 été séchés et recouverts avec une lamelle et de l'Eukitt de manière à protéger les coupes.

6.2.2. Quantification de l'activité CO

Les standards utilisés pour l'étude de l'activité spécifique de la cytochrome oxydase ont été préparés à partir d'homogénats de cerveau entier de rats adultes. L'activité enzymatique des homogénats cérébraux a été mesurée biochimiquement par spectrophotométrie selon la méthode de Hess et Pope (1953). Brièvement, 0,9 ml de solution de cytochrome c (cytochrome c 30 µM dans 0,05 M de tampon phosphate, pH 7 et 0,3% (p / v) d'hydrosulfite de sodium) a été mélangé à 0,1 ml d'homogénat de cerveau dans une solution de désoxycholate de sodium (75%, p / v). Le sodium hydrosulfite réduit le cytochrome c, qui passe d'une coloration saumon à une coloration rose. L'absorption maximale a été mesurée à 550 nm à 22 ° C pendant 3 min.

L'activité enzymatique spécifique de la CO, calculée à partir de la pente linéaire de la courbe obtenue, était de 38,4 µmol/min/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 $r=0.993$). 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 la CO, 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 la CO des structures cérébrales d'intérêt (foetales ou adultes) (Figure B11) 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 µmol/min/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.

7. Exploitation statistique des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *SPSS 16.0* pour *Windows* (SPSS Inc., Chicago, Il., USA). Le seuil de significativité a été fixé à $p = 0,05$, une tendance considérée jusqu'à $p=0, 1$.

7.1. Analyse statistique des données comportementales

Concernant les données comportementales sur les lapereaux au stade PND2, le test du **Chi-Deux de Pearson** a été utilisé pour analyser le pourcentage d'animaux ayant répondu à la phéromone mammaire 2MB2.

Concernant les données comportementales chez les mâles adultes, nous avons réalisé des tests de **Mann-Whitney** pour étudier les diverses variables issues du test de la « boule à thé ».

7.2. Analyse statistique des données expérimentales

Pour chaque variable mesurée, un **test de Levene** pour l'homogénéité des variances a été effectué. Ainsi, étant donné que l'homogénéité de la variance était validée pour la plupart des variables, un **modèle linéaire général (GLM)** a été utilisé pour l'analyse statistique.

Concernant les données expérimentales des animaux au **stade fœtal GD28**, le GLM a été réalisé en utilisant « traitement » et « sexe » comme **facteurs fixes**.

« La portée » a été utilisée comme **co-facteur** afin de s'affranchir d'un potentiel biais statistique dû au fait que les animaux peuvent se développer à des vitesses différentes et répondre différemment aux traitements expérimentaux.

Concernant les données expérimentales des animaux au **stade adulte**, étant donné que le lapin suit un développement cérébral post-natal, le co-facteur « portée » n'est plus considéré comme variable explicative ; le GLM a ainsi été réalisé en utilisant seulement les facteurs fixes « traitement » et « sexe ».

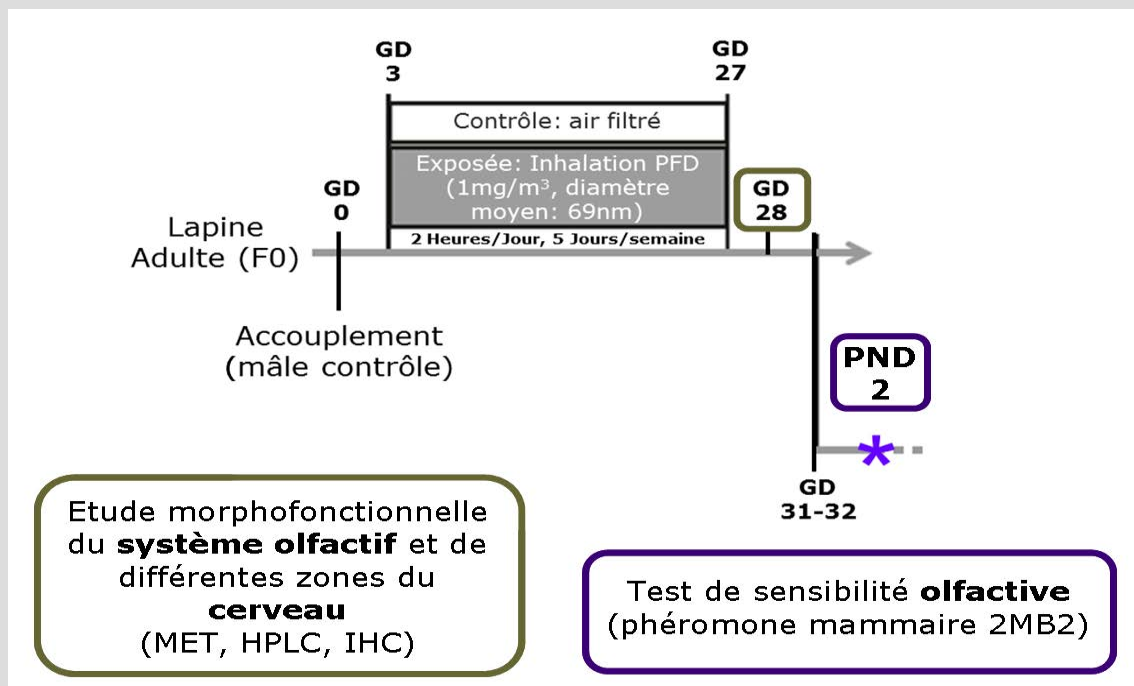
SECTION EXPERIMENTALE

Encadré 8 : Etude des conséquences à court terme d'une exposition gestationnelle aux PFD

La neurotoxicité des PFD sur **la mise en place et la préservation** anatomo-fonctionnelle des circuits neuronaux centraux et périphériques au cours du développement a été évaluée selon deux grands axes :

Un axe **post-mortem**, qui s'intéresse, *via* des approches moléculaires, biochimiques et histologiques, à l'analyse de la *dérégulation de facteurs impliqués dans l'homéostasie et les fonctions du cerveau et du tractus olfactif* au 28^e jour de vie fœtale (**GD28**).

Un axe **in vivo**, qui s'intéresse à l'évaluation de la *sensibilité olfactive* des lapereaux mâle et femelle au 2^e jour de développement post-natal (**PND2**) en réponse à la présentation de la phéromone mammaire 2-Methyl-3-butyln-2-ol (2MB2).



Partie I – Effets neurotoxiques à court terme d’une exposition gestationnelle répétée aux particules de fumée de diesel

<u>1</u>	Étude sur le système olfactif fœtal et le comportement olfactif à court terme	83
<u>2</u>	Étude sur le système nerveux central du fœtus	91

Il s’agira dans cette partie de présenter, dans un premier temps, les résultats anatomiques et fonctionnels observés au niveau du système olfactif des fœtus exposés pendant la gestation ; Cette partie est partiellement reprise dans les annexes, car elle fait l’objet d’un article paru dans *Particle and Fibre Toxicology* (Bernal-Meléndez et al., 2019, Annexe 5). Puis, dans un deuxième temps, nous verrons les données obtenues sur les effets des PFD au niveau du système nerveux central dans la perspective de pouvoir aborder, au niveau de la section conclusive, la plasticité à court terme du continuum anatomo-fonctionnel sous l’effet de ce type d’exposition au stade fœtal (Encadré 8).

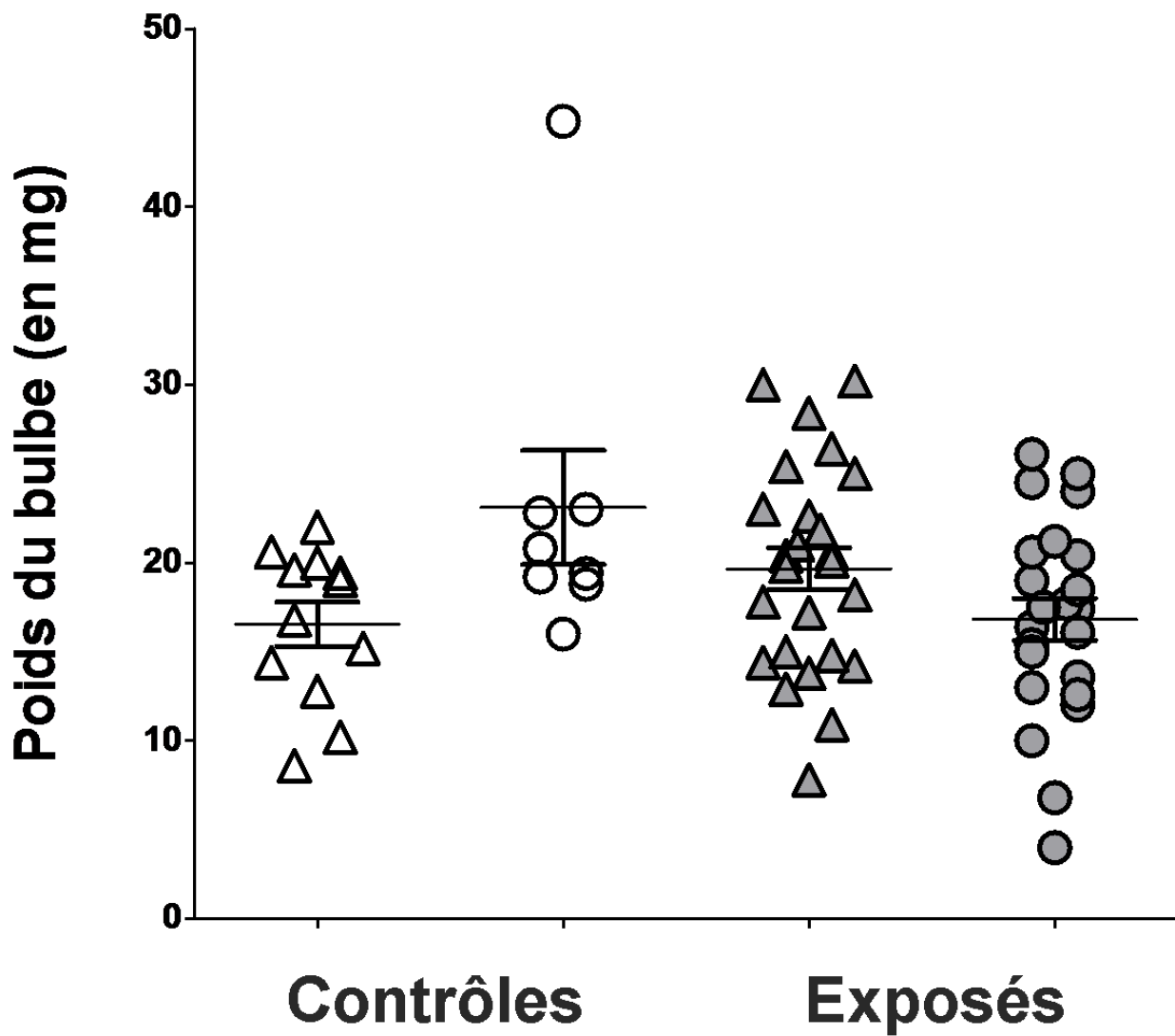


Figure C1 : Poids du bulbe olfactif des fœtus de la génération F1 prélevés à GD28. 20 animaux issus de mères contrôles (N=8 mâles et N=12 femelles, en blanc, issus de 3 portées différentes) et 48 animaux issus de mères exposées (N=23 mâles et N=25 femelles, en gris, issus de 5 portées différentes) ont été sacrifiés au 28^e jour de gestation, et les bulbes olfactifs disséqués et pesés. Les résultats sont exprimés en nuage de points avec représentation de la moyenne $\pm$ ESM (erreur standard à la moyenne). * : <0.05 ; ** : <0.01 . Les femelles sont représentées par des triangles, les mâles par des cercles.

1. Étude des effets de l'exposition aux PFD sur le système olfactif fœtal et le comportement olfactif à court terme

1.1. Analyse du poids des bulbes olfactifs

L'analyse statistique des poids des bulbes olfactifs (BO) prélevés sur les fœtus de plusieurs portées contrôles ou exposées n'a pas mis en évidence d'effets liés à l'exposition ($F_{(1,67)} = 0.586$, $p = 0.447$) ou au sexe ($F_{(1,67)} = 1.137$, $p = 0.290$). En revanche, une interaction entre le type d'exposition et le sexe a été observée ($F_{(1,67)} = 7.973$, $p = 0.006$) qui montre une augmentation de 19% du poids des BO fœtaux des femelles exposées par rapport aux femelles contrôles et une diminution de 27% chez les mâles exposés par rapport aux mâles contrôles (Figure C1).

Ces résultats indiquent donc que l'exposition gestationnelle répétée aux PFD mène à des altérations sexe-dépendantes de la croissance bulbaire chez les animaux exposés de la génération F1 au stade GD28.

1.2. Étude structurale et ultrastructurale des tissus olfactifs

Afin de déterminer les causes possibles de la modification du poids des BO des animaux exposés aux PFD, nous avons effectué une analyse structurale et ultrastructurale de la MO et du BO prélevés à la fin de la gestation, ces 2 structures étant liées sur le plan anatomo-fonctionnel. Pour cela, 4 fœtus témoins et 4 fœtus exposés (un mâle et une femelle issus de 2 portées) ont été préparés pour être analysés sur le plan histologique. Cette analyse a eu également pour but la recherche de la présence de particules dans le système olfactif.

1.2.1. Analyse structurale et ultrastructurale de la muqueuse olfactive

Les observations ont été effectuées à différents niveaux de la MO, depuis la partie apicale de l'épithélium (en contact avec le mucus et le liquide amniotique) jusqu'aux fascicules axonaux situés sous la *lamina propria* (Figure C2 et Annexe 5, Fig.1). La MO des fœtus mâles et femelles issus de lapines contrôles a présenté une organisation normale de type pseudo-stratifiée, avec une sous-muqueuse dense portant de nombreux vaisseaux sanguins, et de nombreux fascicules axonaux (Annexe 5, Fig.1a et 1c). Concernant les fœtus prélevés chez les lapines exposées, ces tissus ont révélé une désorganisation relative de la couche de cellules épithéliales, avec plusieurs espaces vides visibles au niveau basal (Annexe 5, Fig.1b). La fasciculation des axones sous la *lamina propria* est également affectée avec certaines sections de faisceaux axonaux moins compactes (Annexe 5, Fig.1d). Enfin, il est à noter que l'épaisseur de la MO reste semblable entre les deux groupes d'animaux en dépit de ces modifications histologiques sous l'effet de l'exposition aux PFD, mais nous n'avons pas réalisé de mesures systématiques.

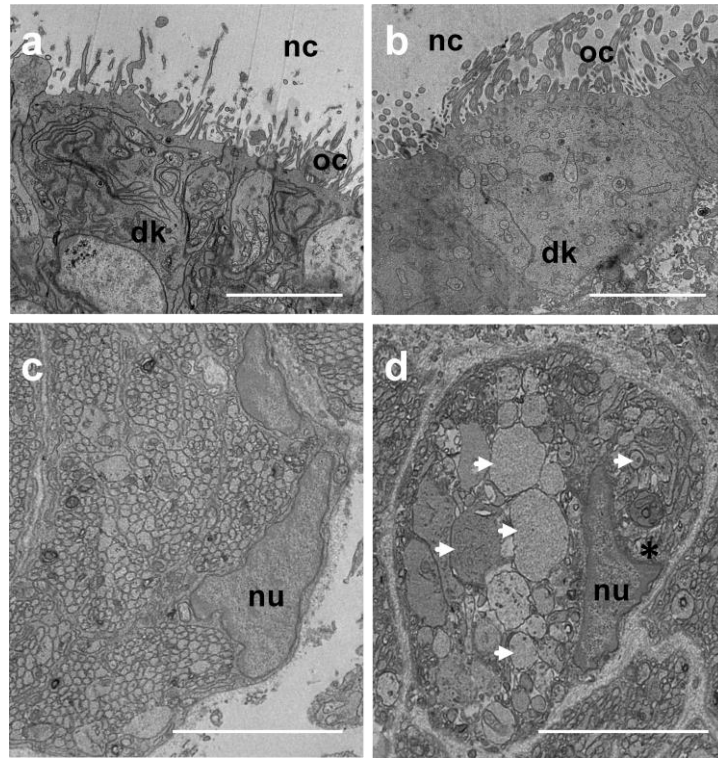


Figure C2: Micrographie électronique des boutons dendritiques d'un neurone sensoriel olfactif (OSN) et des faisceaux d'axones olfactifs de fœtus F1 issus de mères contrôles (a-c) et exposées (b-d). Notez la diminution d'organites cellulaires au niveau des boutons dendritiques chez les fœtus issus de lapines exposées (b), par rapport à ceux issus de lapines contrôles (a).

Les flèches blanches indiquent l'hypertrophie axonale des axones olfactifs des fœtus exposés (d), non observée chez les fœtus témoins (c). Notez la condensation et la marginalisation de la chromatine des cellules engainantes (EOC) chez les fœtus issus de mères exposées par rapport à ceux issus de mères contrôles (étoile noire). Barre d'échelle : 5 μ m. dk : bouton dendritique ; nc : cavité nasale ; nu : noyau ; oc : cils olfactifs.

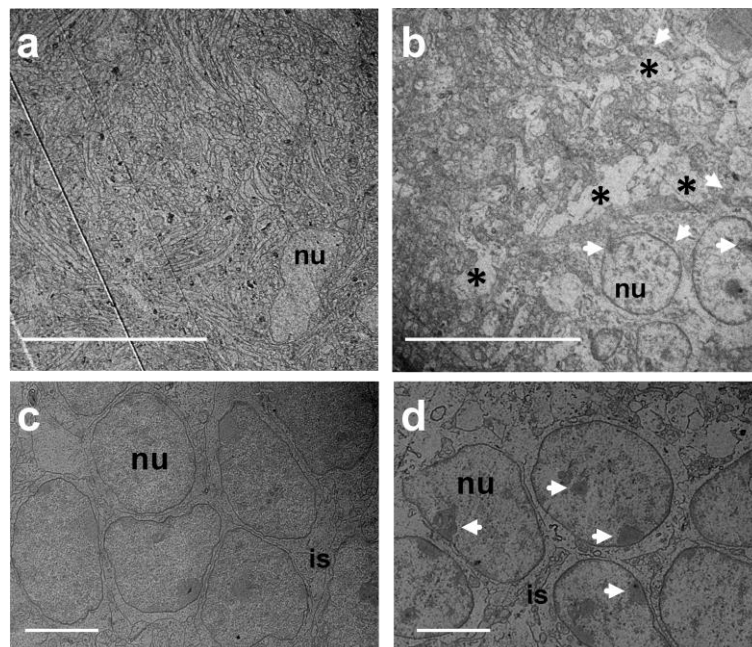


Figure C3 : Micrographie électronique de la couche glomérulaire des BO des fœtus F1 issus de mères contrôles (a) et exposées (b).

Notez une diminution des arrivées axonales et la présence de zones vides (étoiles noires) autour du glomérule des fœtus issus de lapines exposées (b), comparées à ceux de fœtus issus de lapines contrôles (a). Les cellules périglomérulaires (PG) des fœtus issus de mères exposées présentent une hypertrophie et une condensation et une marginalisation de leur chromatine (flèches blanches) par rapport aux PG des fœtus issus de mères contrôles. Barre d'échelle: 20 μ m. **Micrographie électronique de la couche granulaire (Gr) des BO des fœtus issus de mères contrôles (c) et exposées (d).** Notez la perturbation des grappes de cellules granulaires, ainsi qu'une condensation et une marginalisation de leur chromatine chez les fœtus issus de lapines exposées (d), comparées à ceux de fœtus issus de lapines contrôles (c). Barre d'échelle: 5 μ m. is : espace intercellulaire ; nu : noyau.

Au niveau ultrastructural, une altération de la densité des organites cellulaires au niveau de certaines terminaisons dendritiques des neurones sensoriels olfactifs (OSN) des fœtus exposés a été observée (Figure C2b comparé à Figure C2a) alors que la densité des cils olfactifs reste comparable entre les fœtus exposés et contrôles.

Sous la *lamina propria*, une hypertrophie des axones de certains faisceaux axonaux des OSN a été observée chez les fœtus issus de mères exposées (Figure C2d comparée à Figure C2c), altération qui fait penser à un phénomène de « swelling » (inflammation généralisée de la cellule) et montrant une hétérogénéité de la taille des axones des OSN (Figure C2d, voir les flèches blanches). On a également observé une condensation et une marginalisation de la chromatine au niveau du noyau des cellules engainantes (EOC) qui suggèrent un état de « souffrance » de ces cellules (Colin-Barenque et al., 2017) (Figure C2d comparé à Figure C2c, voir étoile noire).

1.2.2. Analyse structurale et ultrastructurale du bulbe olfactif

Les observations ont été effectuées sur l'ensemble des couches du BO, avec un intérêt plus particulier pour la couche de cellules glomérulaires, mitrales et granulaires (Figure C3 et Annexe 5, Fig.2).

Comparés aux animaux contrôles (Figure C3a et Annexe 5, Fig.2a), les fœtus exposés ont présenté une diminution de la densité des terminaisons axonales, mise en évidence par la présence de zones vides de matériel biologique autour des glomérules (Figure C3b, voir les étoiles noires et Annexe 5, Fig.2b1). Les cellules périglomérulaires (PG) présentaient une hypertrophie cellulaire (« swelling ») ainsi qu'une condensation et une marginalisation de la chromatine sur certains noyaux (Figure C3b, voir flèches blanches). De plus, la cyto-architecture de la couche de cellules granulaires (Gr), qui normalement est organisée en « clusters » (groupes restreints et bien définis de synapses entre cellules mitrales et cellules granulaires (Migliore et al, 2015 ; Willhite et al, 2006)), semble modifiée. En effet, il a été noté ici une désorganisation des grappes granulaires marquée par un défaut de la liaison entre les cellules (Figure C3d comparée à C3c et Annexe 5, Fig.2b3). Il est intéressant de remarquer que les cellules granulaires des fœtus issus des femelles exposées présentaient également une condensation et une marginalisation de la chromatine (Figure C3d, voir flèches blanches).

Concernant la couche des cellules mitrales, aucune altération neuroanatomique n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (Annexe 5, Fig.2).

L'ensemble de ces observations montre des altérations au niveau des zones de réception (MO) et de traitement (BO) des stimuli olfactifs, avec une diminution de la densité des terminaisons axonales des OSN en provenance de la MO, ce qui pourrait entraîner une altération dans la convergence et la synchronisation de l'information sensorielle vers le BO. De plus, nos observations mettent en évidence des altérations cyto-structurales au sein du BO suggérant une atrophie des cellules périglomérulaires et

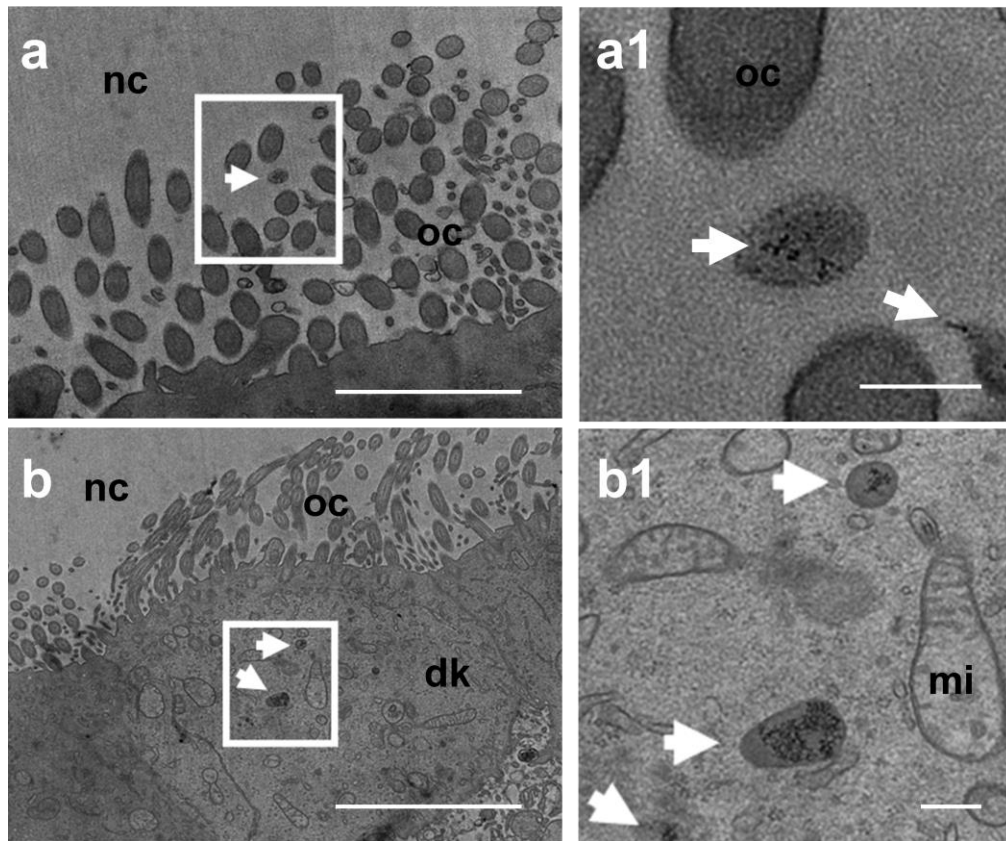


Figure C4 : Micrographie électronique de la partie apicale de l'épithélium olfactif des fœtus F1 issus de mères exposées. La Figure C4a présente les cils des OSN. La structure dans le cadre blanc est présentée en Figure C6a1 à un grossissement plus élevé. Les flèches blanches indiquent des dépôts particuliers dispersés (15-20 nm de diamètre), que ce soit à l'intérieur des cils olfactifs ou en contact avec les cils olfactifs. La Figure C4b présente Le cytoplasme des OSN. La structure dans le cadre blanc est présentée en Figure C4b1 à un grossissement plus élevé. Les flèches blanches indiquent des vésicules de type lysosome contenant ces « particules-like » (15-20 nm de diamètre). Barres d'échelle : a et b : 5 μ m ; a1 et b1 : 200nm. dk : bouton dendritique ; nc : cavité nasale ; oc : cils olfactifs ; mi : mitochondrie.

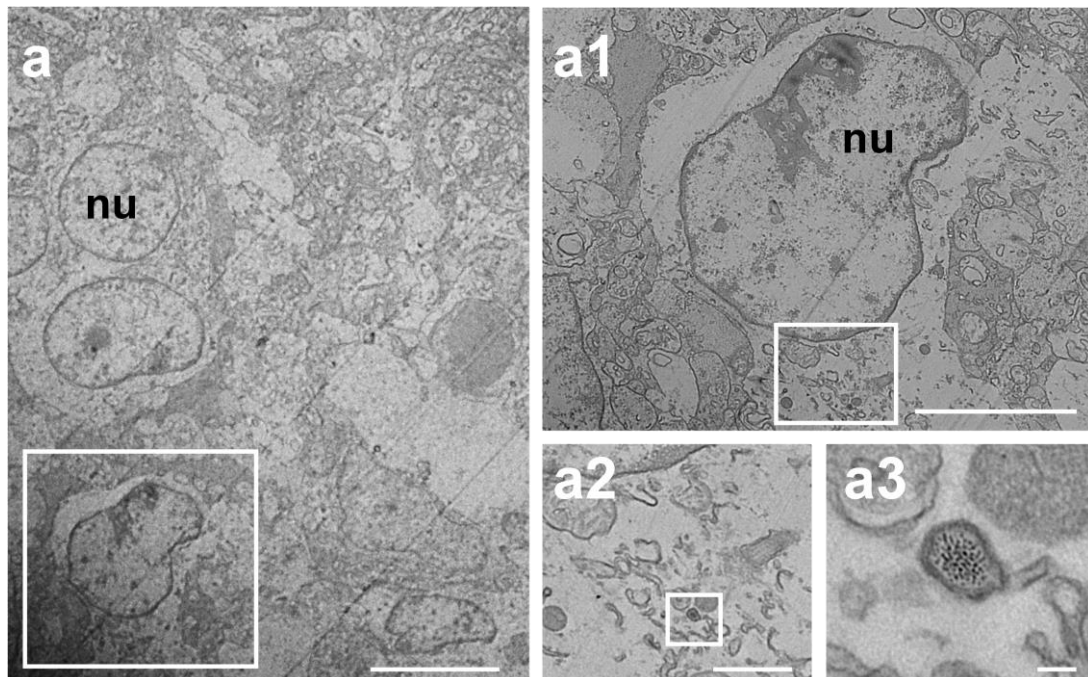


Figure C5: Micrographie électronique de la couche glomérulaire des bulbes olfactifs des fœtus F1 issus de mères exposées. La Figure C5a présente une partie d'un glomérule d'un fœtus issu de lapine exposée montrant la présence de dépôts particuliers dans le cytoplasme d'une PG. Les Figures C5a1, C5a2 et C5a3 sont des agrandissements à fort grossissement pour désigner des vésicules de type lysosome contenant ces dépôts particuliers (5 nm de diamètre). Barres d'échelle : a : 10 μ m ; a1, a2 et b1 : 5 μ m ; 1 μ m et 50nm, respectivement. nu : noyau.

granulaires, interneurones prépondérants et largement impliqués dans le décodage de l'information sensorielle *via* l'inhibition latérale qui existe entre cellules mitrales.

Ainsi, cette analyse a montré que l'exposition gestationnelle répétée aux PFD semble affecter les structures responsables de l'intégration du signal olfactif avant qu'il ne soit transmis vers des structures intégratives plus centrales telles que le cortex piriforme, suggérant *in fine* de possibles perturbations de la perception des odeurs chez ces animaux.

Il est à noter que le faible échantillonnage et les techniques utilisées n'ont pas permis de révéler des altérations cytoarchitecturales liées au sexe entre les fœtus dans les structures d'intérêt.

1.2.3. Mise en évidence de la présence de dépôts particuliers au niveau du système olfactif

Afin de déterminer si les PFD ont pu atteindre le fœtus, la présence de particules sur des coupes ultrafines de MO et BO analysées par MET a été recherchée.

Des dépôts opaques aux électrons de diamètre 15 à 20 nm, ressemblant à des particules, ont été observés chez plusieurs fœtus exposés (deux fœtus mâles et deux femelles issus de deux lapines différentes), l'analyse des fœtus contrôles ne montrant aucun dépôt dans ces tissus malgré l'observation de plusieurs blocs indépendants. Ces dépôts ont été identifiés en défocalisant l'image (en jouant sur la mise au point du microscope électronique), ce qui permet de visualiser plus nettement l'aspect métallique des dépôts, caractéristique des nanoparticules de ce type (Annexe 6). Cependant, la démonstration qu'il s'agit de nanoparticules n'a pas été faite, ce qui nous a conduit à les dénommer « particles-like » dans l'article et dans la suite de ce document.

Les « particles-like » étaient principalement localisées au niveau des cils (Figure C4a) ou du cytoplasme des boutons dendritiques des OSN (Figure C4b). Au niveau des cils, ces dépôts ont toujours été observés sous forme de particules isolées (Figure C4a1, flèches blanches) alors que dans le cytoplasme, elles étaient toujours concentrées dans des vésicules semblables à des lysosomes (Figures C4b et C4b1, flèches blanches). Ces « particles-like » n'ont pas été retrouvées au niveau des autres structures de la MO analysées (cellules de soutien, partie basale contenant les précurseurs neuronaux) malgré l'observation de plusieurs animaux et de plusieurs grilles d'échantillons de MET.

Dans le BO, ces « particles-like » ont été uniquement observées dans des vésicules de type lysosome au niveau du cytoplasme des cellules PG des fœtus issus de lapines exposées; elles s'avèrent être de plus petite taille que celles observées au niveau de la MO (5 nm de diamètre en moyenne) (Figure C5).

Enfin, aucun dépôt de type particulière n'a été visualisé dans d'autres régions comme la couche des cellules mitrales ou la couche granulaire sur les animaux contrôles comme exposés.

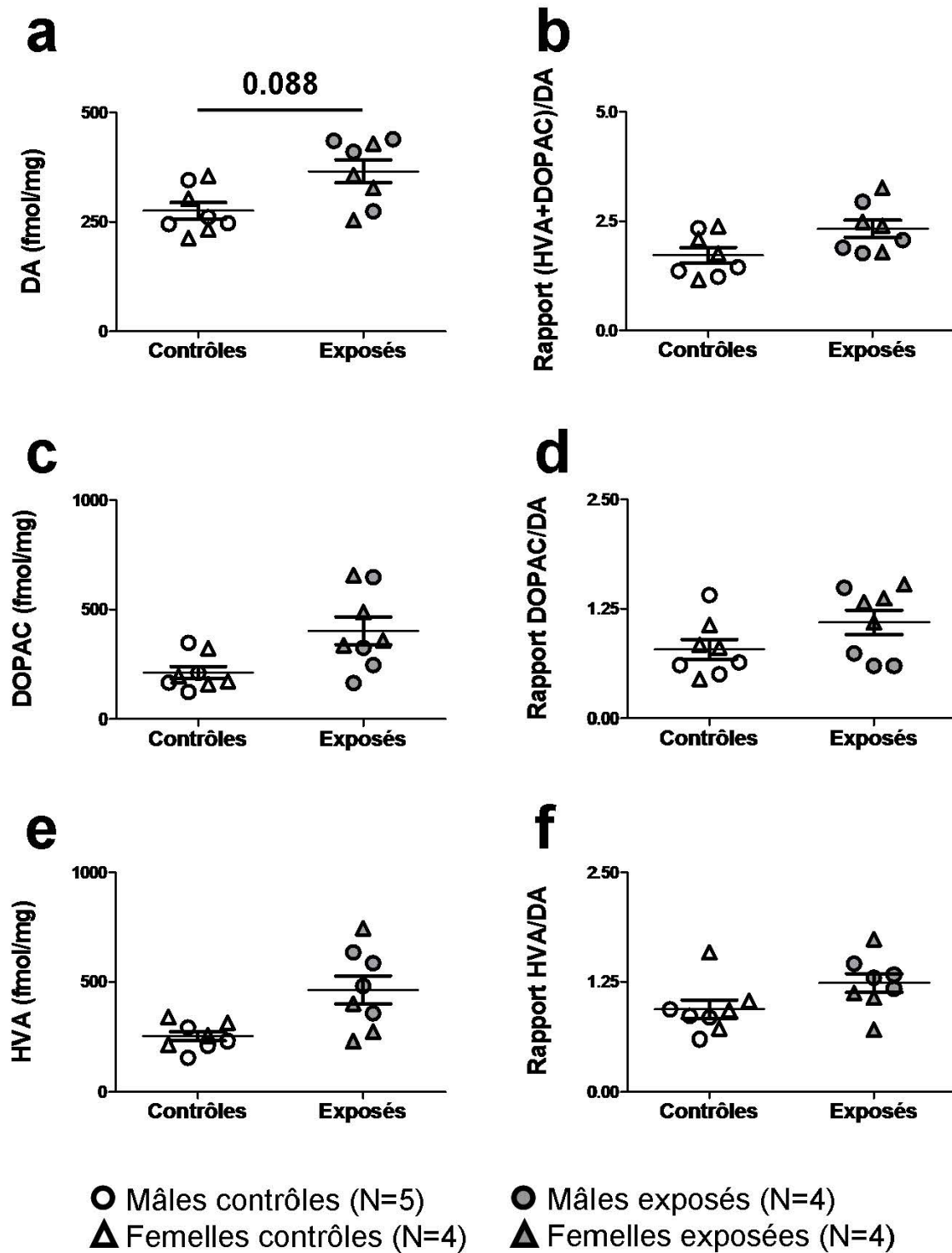


Figure C6 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie dopaminergique bulbaire chez des fœtus F1. Les résultats obtenus chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=5 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux issus des fœtus issus de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **DA** : Dopamine ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HVA** : Acide homovanillique.

1.3. Analyse de la neuromodulation au niveau du système olfactif

La mise en évidence des atteintes tissulaires dans les structures olfactives des fœtus portés par les mères exposées pouvant suggérer des atteintes fonctionnelles, il est apparu intéressant d'étudier les effets sur la neuromodulation des réponses olfactives *via* des approches neurochimiques et immunohistochimiques.

1.3.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique

1.3.1.1. Approche neurochimique

Au niveau de la voie dopaminergique, on note une augmentation de 33% du niveau de DA des animaux issus de mères exposées comparé à celui des animaux issus de mères contrôles, bien que non significative ($F_{(1,15)} = 3.457$, $p = 0.088$) (Figure C6a) ; aucune différence liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.525$, $p = 0.484$) ou mettant en évidence une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.262$, $p = 0.619$).

Concernant les deux métabolites principaux de la DA, l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) et l'acide homovanillique (HVA) ainsi que les rapports (HVA/DA, DOPAC/DA et (HVA+DOPAC)/DA), aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (Figure C6). Il est à noter une dispersion importante des niveaux de DOPAC et HVA chez les animaux exposés, non observée chez les témoins.

1.3.1.2. Approche immunohistochimique

Afin d'établir un lien entre les possibles altérations anatomiques et neurochimiques du système dopaminergique, l'étude immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme limitante de la production des catécholamines) a été mise en place.

La quantification de la sous-population intrinsèque de cellules dopaminergiques dans la couche glomérulaire (Figure C7a) n'a montré aucune modification significative du nombre de cellules dopaminergiques TH⁺ par unité de surface entre les deux groupes d'animaux (Figure C7b).

Concernant l'intensité moyenne de marquage des cellules TH⁺ (Figure C7c), l'analyse statistique a mis en évidence une augmentation de 39% chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux animaux issus de femelles contrôles ($F_{(1,20)} = 4.906$, $p = 0.042$) ; cette altération n'est pas liée au sexe ($F_{(1,20)} = 0.078$, $p = 0.784$) et aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,20)} = 0.066$, $p = 0.801$) (Figure C7d).

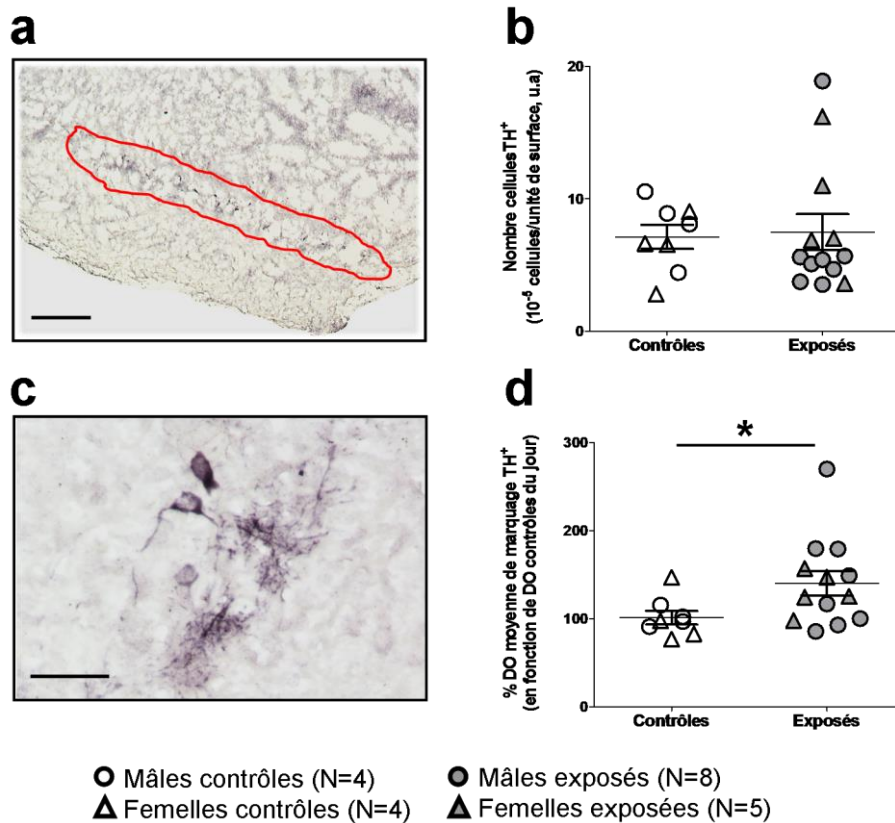


Figure C7 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les cellules dopaminergiques bulbares chez des fœtus F1. a. Image représentant les cellules TH⁺ au niveau de la zone glomérulaire au sein la zone sélectionnée (ROI, en rouge). Barre d'échelle: 100 μ m. b. Représentation graphique du nombre de cellules TH⁺ normalisé à la ROI. c. Image représentant les cellules TH⁺ et les ROI sélectionnées (en rouge) pour l'étude de l'intensité de marquage au sein de ces dernières. Barre d'échelle: 20 μ m. d. Représentation graphique du pourcentage d'intensité moyenne de marquage TH⁺ normalisé à la densité moyenne de marquage de contrôles du jour. Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. Les figures en blanc correspondent aux résultats obtenus chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles) ; les figures grises, à ceux issus des fœtus issus de femelles exposées (N=8 mâles ; N=5 femelles). * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

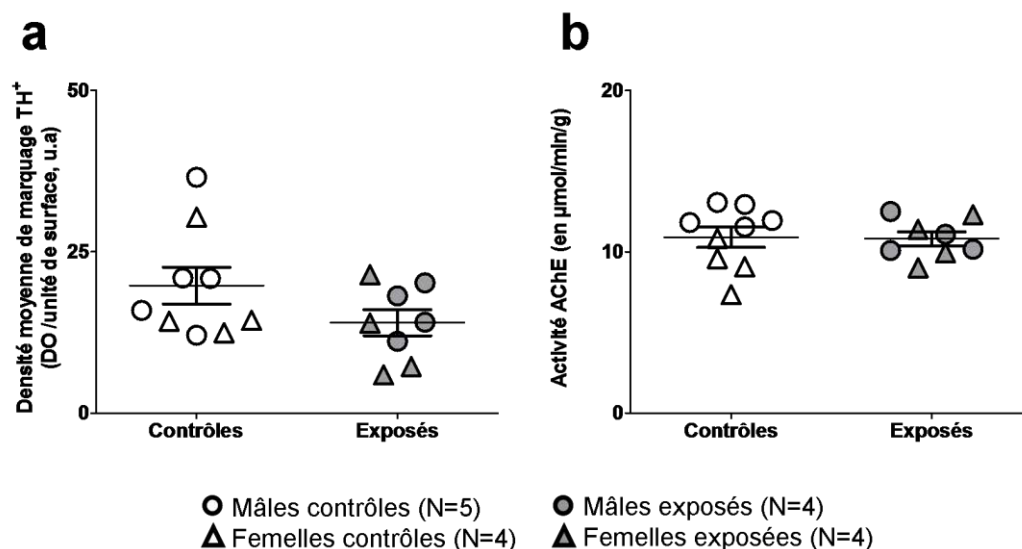


Figure C8 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les arrivées axonales dopaminergiques et cholinergiques au niveau du BO des fœtus F1. a. Représentation graphique de la densité moyenne de marquage TH⁺ au niveau du tubercule olfactif (Tu). b. Représentation graphique de l'activité AChE au niveau du Tu. Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. Les figures en blanc correspondent aux résultats obtenus chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=5 mâles ; N=4 femelles) ; les figures grises, à ceux issus des fœtus issus de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles). * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

Au niveau du tubercule olfactif (Tu), voie d'entrée des afférences neuromodulatrices dans le BO, la densité moyenne du marquage TH⁺ n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes (Figure C8a).

Ce marquage a été complété par une étude histochimique de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), prise comme un indicateur de l'intégrité de circuits neuronaux, et mesurée dans la même région. Les résultats ont montré que cette activité (Figure C8b) n'est pas modulée par l'exposition aux PFD ($F_{(1,16)} = 0.006$, $p = 0.942$). Cependant, une différence liée au sexe ($F_{(1,16)} = 8.462$, $p = 0.013$) et une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition ($F_{(1,16)} = 5.773$, $p = 0.033$) ont été observées, révélant une augmentation de 16% de l'activité chez les femelles exposées et une diminution de 11% chez les mâles par rapport aux contrôles du même sexe.

1.3.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique

1.3.2.1. Approche neurochimique

Concernant le système sérotoninergique (Figure C9), l'analyse statistique des niveaux tissulaires de 5-HT a mis en évidence une diminution significative de 31% du niveau sérotoninergique bulbaire chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux fœtus contrôles ($F_{(1,15)} = 6.972$, $p = 0.023$), qui n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.046$, $p = 0.833$). Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.724$, $p = 0.413$) (Figure C9a). En ce qui concerne les niveaux de tryptophane (TRP) et de Kynurénine (K) ainsi que le rapport K/TRP, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (résultats non présentés). Le rapport 5-HT/TRP des animaux issus de mères exposées s'est avéré inférieur de 24% par rapport à celui des animaux issus de mères contrôles, bien que non significatif ($F_{(1,15)} = 3.457$, $p = 0.090$) (Figure C9b) ; aucune différence liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.628$, $p = 0.445$) ou mettant en évidence une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.081$, $p = 0.782$).

En ce qui concerne l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) qui est le métabolite principal de la 5-HT ainsi que le rapport 5-HIAA/5-HT, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (Figure C9c et C9d, respectivement).

1.3.2.2. Approche immunohistochimique

Une étude immunohistochimique visant la tryptophane hydroxylase (TrpH, enzyme limitante de la production de sérotonine) a été réalisée dans les mêmes régions olfactives que pour la dopamine, mais les valeurs de marquage se sont avérées trop faibles et non-spécifiques. L'analyse quantitative n'a donc pas pu être réalisée.

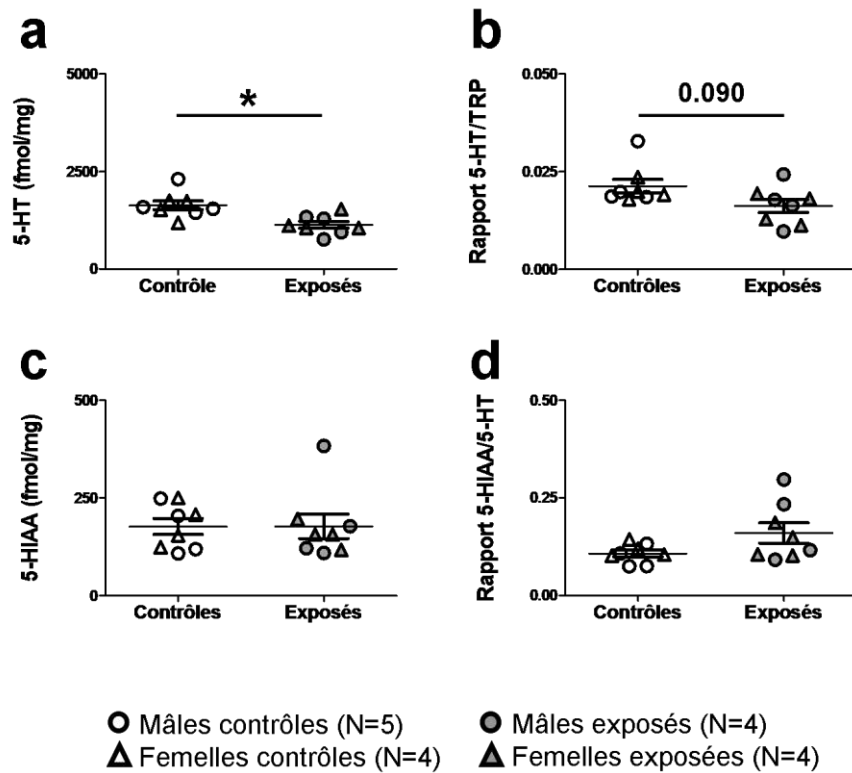


Figure C9 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie sérotoninergique bulbaire des fœtus F1. Les résultats obtenus chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=5 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux issus des fœtus issus de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. 5-HT : Sérotonine ; 5-HIAA : 5-hydroxyindolacétique ; TRP : Tryptophane.

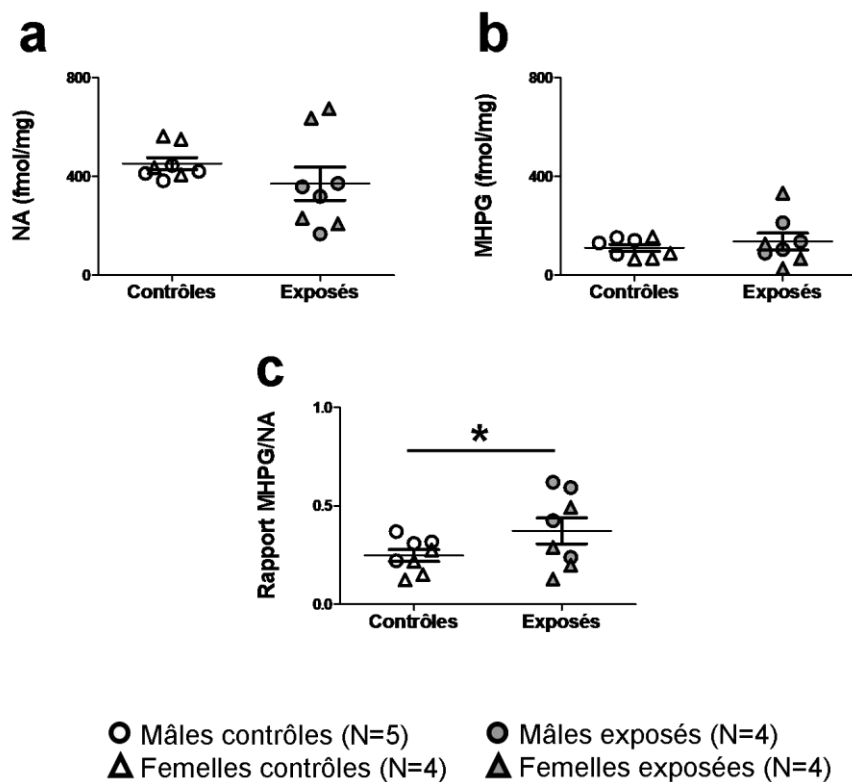


Figure C10 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie noradrénergique bulbaire chez des fœtus F1. Les résultats obtenus chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=5 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux issus des fœtus issus de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. NA : Noradrénaline ; MHPG : 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol.

1.3.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique

En ce qui concerne ce système, seule une approche neurochimique a pu être réalisée. Celle-ci a montré l'absence d'effets de l'exposition aux PDF sur les niveaux de noradrénaline (NA) et de son métabolite principal, le 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MHPG) (Figures C10a et C10b, respectivement). Le rapport MHPG/NA augmente de 50% chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux animaux issus de femelles contrôles ($F_{(1,15)} = 6.466$, $p = 0.027$) avec des différences liées au sexe ($F_{(1,15)} = 5.418$, $p = 0.040$), les femelles présentant des valeurs de rapport plus basses que les mâles. Aucune interaction entre l'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.724$, $p = 0.413$) (Figure C10c).

1.4. Étude immunohistochimique du niveau d'apoptose bulbaire

La présence de particules ainsi que les altérations histologiques et neurochimiques observées au niveau bulbaire, suggérant des atteintes cellulaires, une comparaison du niveau d'apoptose dans le bulbe olfactif entre les fœtus contrôles et exposés a été réalisée par technique TUNEL et après coloration des noyaux au Hoeschst (Figure C11).

Cette analyse a été effectuée sur quatre animaux issus de lapines contrôles (deux mâles et deux femelles issus de deux portées différentes) et sur cinq animaux issus de lapines exposées (un mâle et une femelle issus d'une portée ; deux mâles et une femelle issus d'une autre portée). Le nombre de cellules TUNEL⁺ a été compté manuellement, sur les trois zones choisies, la zone granulaire (Gr), région médiane et riche en cellules, la zone glomérulaire (Gl), présentant les cellules glomérulaires, et la zone intermédiaire (Inter), région intermédiaire entre les zones Gr et Gl, et contenant les couches plexiforme interne et externe et la couche des cellules mitrales (Figure C11a). Une cellule a été considérée comme positive lorsque le marquage TUNEL et la coloration au Hoechst étaient superposés. Ce comptage a été effectué sur 2 coupes non adjacentes par fœtus. Le nombre de cellules TUNEL⁺ a été normalisé à la taille des zones sélectionnées (TUNEL⁺/ROI) et au nombre de cellules Hoeschst (Figure B10). Au moins deux ROI équivalentes indépendantes par section ont été analysées (soit, au moins six mesures réalisées par animal).

Afin d'avoir une estimation de la densité cellulaire dans chaque zone d'intérêt, le pourcentage d'aire marquée au Hoechst (%Hoeschst) a été normalisé par l'aire de la zone d'intérêt. L'analyse statistique sur cette variable n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes d'animaux (Figure C11b), suggérant que la densité cellulaire de chaque zone n'était pas affectée par l'exposition.

Concernant le nombre de cellules apoptotiques (TUNEL⁺) par unité de surface (ROI, u.a) au niveau des zones granulaire (gr) et intermédiaire (inter), aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (Figure C11c).

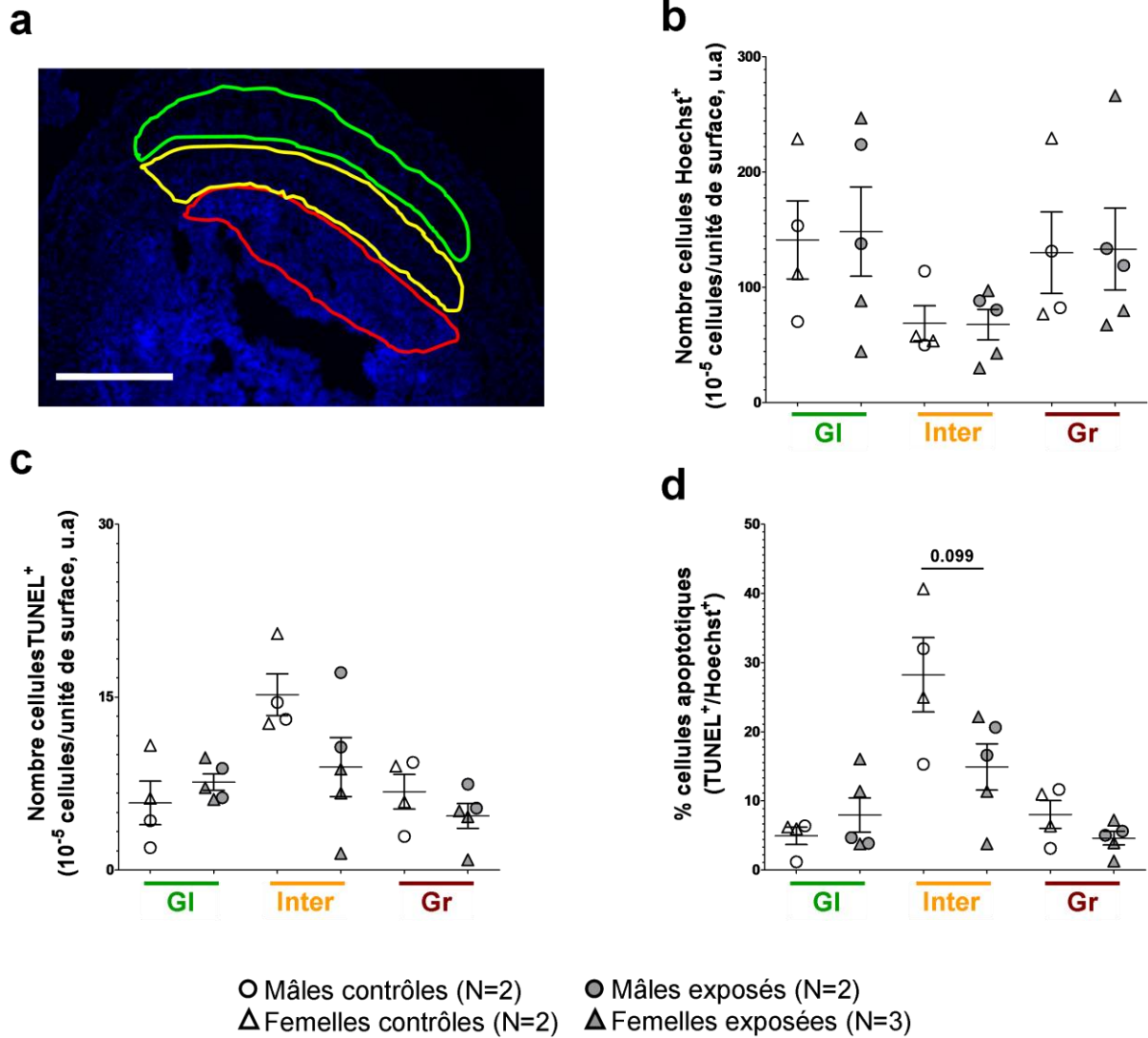


Figure C11 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le niveau apoptotique bulbaire chez des fœtus F1. a. Image représentant les différentes zones sélectionnées (à savoir : Zone glomérulaire, Gl, en Vert ; Zone intermédiaire, Inter, en Jaune ; Zone granulaire, Gr, en rouge). Barre d'échelle : 50 μ m. b. Représentation graphique du nombre de cellules Hoechst⁺ normalisé à la ROI d'intérêt. c. Représentation graphique du nombre de cellules TUNEL⁺ normalisé à la ROI d'intérêt. d. Représentation graphique du pourcentage de cellules apoptotiques (Nombre TUNEL⁺/Hoechst⁺) en fonction de la zone d'intérêt. Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. Les figures en blanc correspondent aux résultats obtenus chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=2 mâles ; N=2 femelles) ; les figures grises, à ceux issus des fœtus issus de femelles exposées (N=2 mâles ; N=3 femelles). * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

Par ailleurs, l'analyse statistique au niveau de la zone glomérulaire n'a pas mis en évidence d'effet de l'exposition sur le nombre de cellules apoptotiques ($F_{(1,8)} = 3.958$, $p = 0.118$), mais une différence liée au sexe ($F_{(1,8)} = 10.512$, $p = 0.032$) et une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition ($F_{(1,8)} = 13.787$, $p = 0.021$). On note une diminution de 10% du nombre de cellules apoptotiques par ROI chez les fœtus femelles exposés par rapport aux fœtus contrôles du même sexe, et une augmentation de 143% du nombre de cellules apoptotiques par ROI chez les mâles exposés par rapport aux mâles contrôles (Figure C11c).

Finalement, le nombre de cellules TUNEL⁺ a été rapporté à la densité cellulaire estimée dans chaque zone par marquage des noyaux (Figure C11d). Ainsi, le pourcentage de cellules apoptotiques au niveau de la zone intermédiaire (Inter) des animaux issus de mères exposées s'est avéré inférieur de 47% par rapport à celui des animaux issus des mères contrôles, bien que non significatif ($F_{(1,8)} = 4.596$, $p = 0.099$). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux concernant le pourcentage de cellules apoptotiques au niveau des zones glomérulaire (GI) et granulaire (Gr) (Figure C11d).

Cette approche a permis de mettre en évidence des modifications du niveau d'apoptose dans le BO associées à l'exposition aux PFD, avec une augmentation du nombre de cellules apoptotiques dans la zone glomérulaire chez les mâles, et une tendance à la baisse dans la zone intermédiaire pour les deux sexes. Cependant, le faible échantillonnage et l'hétérogénéité des groupes étudiés font que ces résultats sont à considérer avec précaution et doivent être confirmés sur de nouveaux échantillons.

1.5. Analyse de la sensibilité olfactive chez les lapereaux à PND2

Afin d'étudier les conséquences des perturbations anatomiques et neurochimiques observées au niveau des tissus au stade fœtal GD28 sur la sensibilité olfactive de la descendance, un test de reconnaissance à la phéromone mammaire 2MB2 a été réalisé chez les nouveau-nés âgés de 2 jours (PND2), nés de mères contrôles ou exposées aux PFD (Figure C12).

L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence significative entre le pourcentage de réponses positives à la présentation de la phéromone 2MB2 chez les animaux issus de mères contrôles (66%) par rapport au pourcentage théorique attendu pour la concentration utilisée (pour une concentration de 5.10^{-8} M, le pourcentage de réponse théorique est de 60%, selon [Schaal et al, 2003](#) et [Coureau et al, 2004](#)) (χ^2 de Pearson, $df = 0.5269$; $p = 0.4679$). En revanche, une diminution significative du pourcentage de réponses positives à la phéromone 2MB2 chez les animaux issus de mères exposées (41%) a été observée par rapport au pourcentage attendu (χ^2 de Pearson, $df = 9.1667$, $p = 0.0025$).

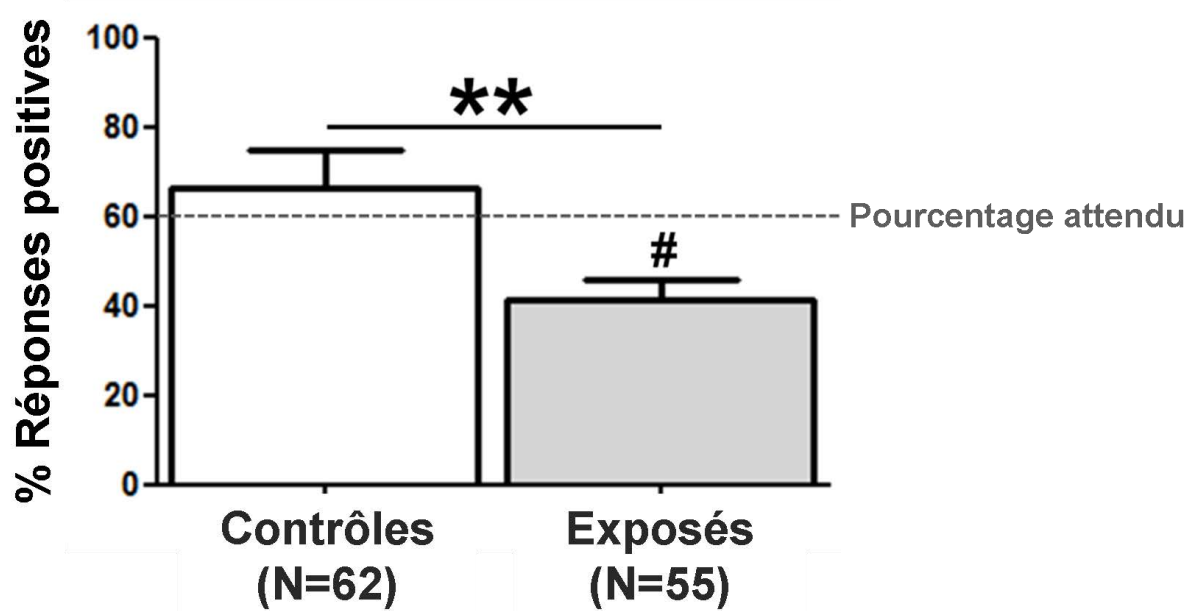


Figure C12 : Pourcentage de réponses positives des lapins à PND2 suite à la présentation de la phéromone mammaire de lapin 2MB2. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ ESM pour chaque groupe. # $p < 0,01$ représente une différence significative entre les groupes et le pourcentage attendu. En effet, le pourcentage observé de réponses positives chez les lapereaux issus de mères exposées (40%, 22/55) était significativement plus faible, alors que celui des animaux issus de mères contrôles (65%, 40/ 62) n'était pas significativement différent. La ligne en pointillés représente le pourcentage de réponse attendu (d'après Schaal et al, 2003 et Coureau et al, 2004). ** $p < 0,01$ représente une différence significative entre les deux groupes.

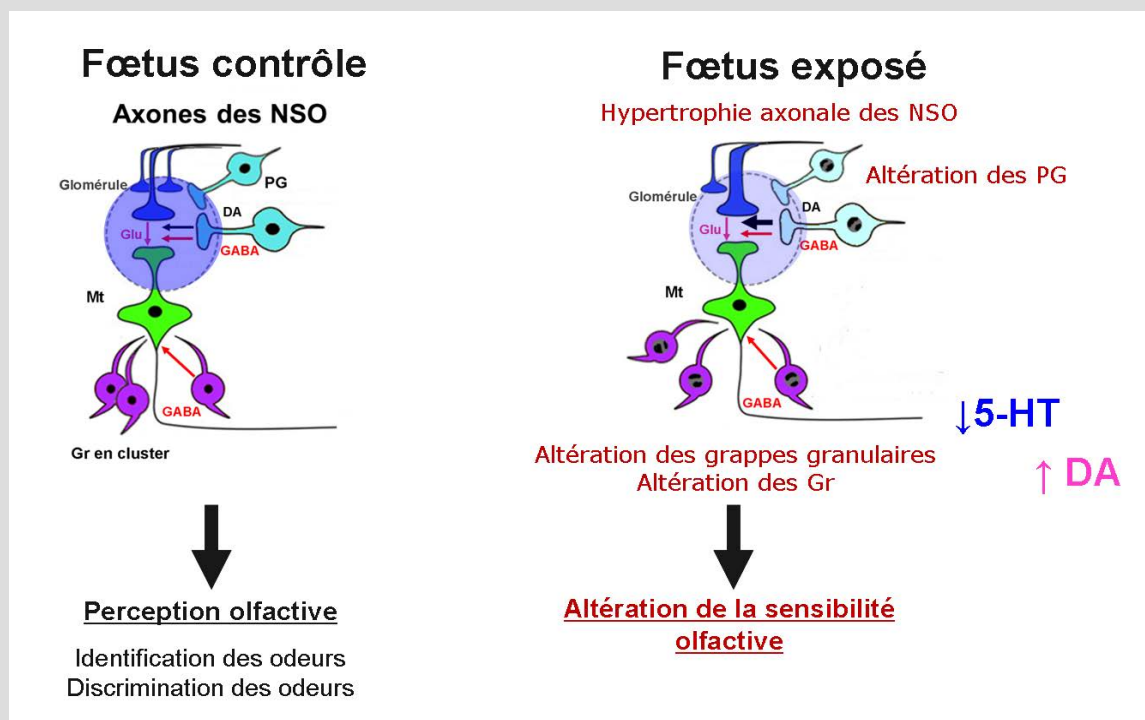
Enfin, le pourcentage de réponses positives à la présentation de cette phéromone chez les animaux issus de mères exposées est significativement plus faible que chez les animaux issus de mères contrôles (Chi-square de Pearson, $df = 7.032$; $p = 0.008$) (Figure C12), indiquant une altération de la réponse olfactive qui pourrait être en lien avec les désordres histologiques observés au niveau des tissus olfactifs chez les lapereaux nés de mères exposés.

L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans l'encadré 9.

Encadré 9 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur le système olfactif des animaux de la génération F1 au stade fœtal

Les principaux résultats qui ont été obtenus indiquent qu'une exposition gestationnelle répétée aux particules de fumées de diesel est à même d'induire des perturbations du développement et du maintien des circuits neuronaux olfactifs et centraux. Ce constat s'appuie sur 1) la mise en évidence de **dépôts de taille nanométrique** (5-20nm de diamètre) dans les structures olfactives des fœtus de la génération F1 au stade de GD28, 2) l'observation de **déstructurations majeures des tissus olfactifs**, ainsi qu'une condensation et une marginalisation de la chromatine de différents types cellulaires qui les constituent, et 3) la mise en évidence d'altérations précoces des **voies sérotoninergique et dopaminergique** bulbaires.

Cette exposition semble ainsi mener à des **modifications précoces de la sensibilité olfactive** chez les lapereaux, bien qu'il ne soit pas possible, à ce stade, de faire un lien direct entre les perturbations anatomo-fonctionnelles du système olfactif à GD28 et comportementales à PND2.



Représentation schématique des résultats obtenus au niveau des circuits neuronaux olfactifs des animaux exposés aux PFD pendant la gestation. 5-HT : Sérotonine ; DA : Dopamine ; GABA : Acide γ-aminobutyrique ; Glu : Glutamate ; Gr : Cellule granulaire ; Mt : Cellules relais (cellules Mitrale et à Panache) ; NSO : Neurone sensoriel olfactif ; PG : Cellule péraglomérulaire. Image inspirée de [Mundifano et al., 2011](#).

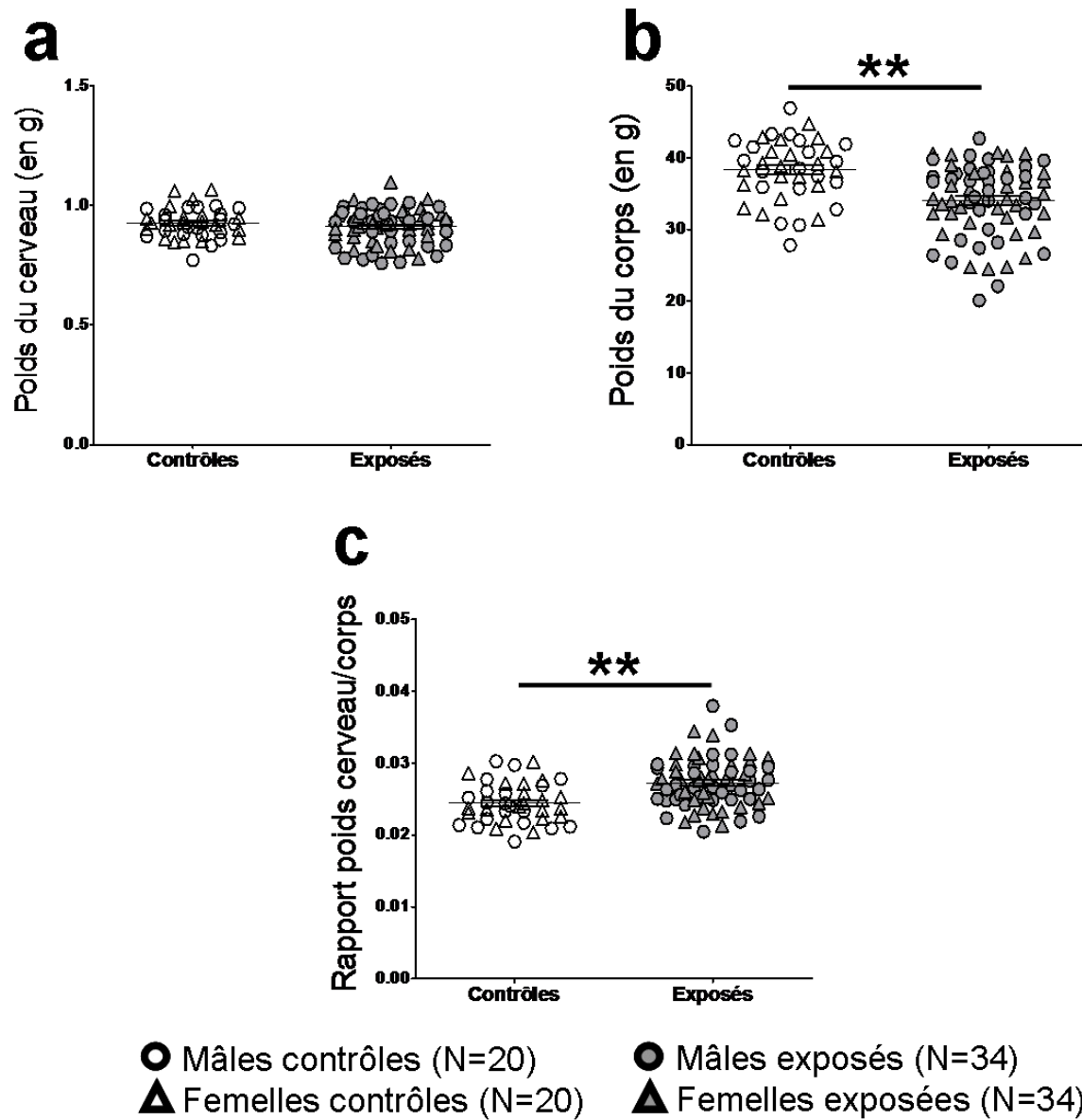


Figure C13 : Mesures morphométriques du cerveau et du corps des fœtus de la génération F1 prélevés à GD28. 40 animaux issus de mères contrôles (N=20 mâles et N=20 femelles, en blanc, issus de 5 portées différentes) et 68 animaux issus de mères exposées (N=34 mâles et N=34 femelles, en gris, issus de 7 portées différentes) ont été sacrifiés au 28^e jour de gestation, les cerveaux ont été disséqués et pesés (a) après avoir pesé le corps entier (b). Du fait de l'effet de la pollution sur le poids corporel total, le rapport poids du cerveau/poids total a été calculé (c). Les résultats sont exprimés en nuage de points avec représentation de la moyenne $\pm$ ESM (erreur standard à la moyenne). **: <0.001 . Les femelles sont représentées par des triangles ; les mâles sont représentés par de cercles.

2. Étude des effets de l'exposition aux PFD sur le système nerveux central du fœtus

2.1. Analyse du poids corporel et du poids des cerveaux

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps à l'analyse du poids corporel, ainsi que du poids du cerveau des fœtus F1. En effet, les différentes mesures biométriques effectuées par nos collaborateurs avaient montré une diminution de la longueur de la tête, ainsi qu'une diminution de l'efficacité placentaire chez les animaux issus de mères exposées par rapport à ceux nés de mères contrôles (Valentino et al, 2016a, 2016b), ce qui pose la question de possibles modifications de la biométrie au niveau cérébral.

L'analyse statistique de la taille et la composition des portées ne met pas en évidence de différence significative entre les deux groupes d'animaux (résultats non présentés).

L'analyse statistique des poids des cerveaux prélevés n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes (Figure C13a).

En ce qui concerne le poids corporel (Figure C13b), l'analyse statistique a mis en évidence une diminution de 11% chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux fœtus contrôles ($F_{(1,107)} = 12.987$, $p < 0.001$) ; cette baisse n'est pas liée au sexe ($F_{(1,107)} = 0.113$, $p = 0.737$) et ne met pas en évidence d'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,107)} = 0.061$, $p = 0.806$).

Enfin, l'analyse du poids du cerveau rapporté au poids du corps montre une augmentation de 11.6% chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,107)} = 13.174$, $p < 0.001$) (Figure C13c), modification qui n'est pas liée au sexe ($F_{(1,107)} = 0.003$, $p = 0.957$) et ne résulte pas d'une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,107)} = 0.049$, $p = 0.825$).

L'ensemble de ces résultats indique que l'exposition gestationnelle répétée aux PFD mène à des modifications de la croissance fœtale sans pour autant affecter la croissance cérébrale chez les animaux de la génération F1 au stade GD28.

2.2. Analyse de la neuromodulation au niveau du système nerveux central

Afin d'établir un lien entre les perturbations anatomiques et neurochimiques observées au niveau du système olfactif, une étude de la neuromodulation centrale *via* des approches neurochimiques et immunohistochimique a été réalisée.

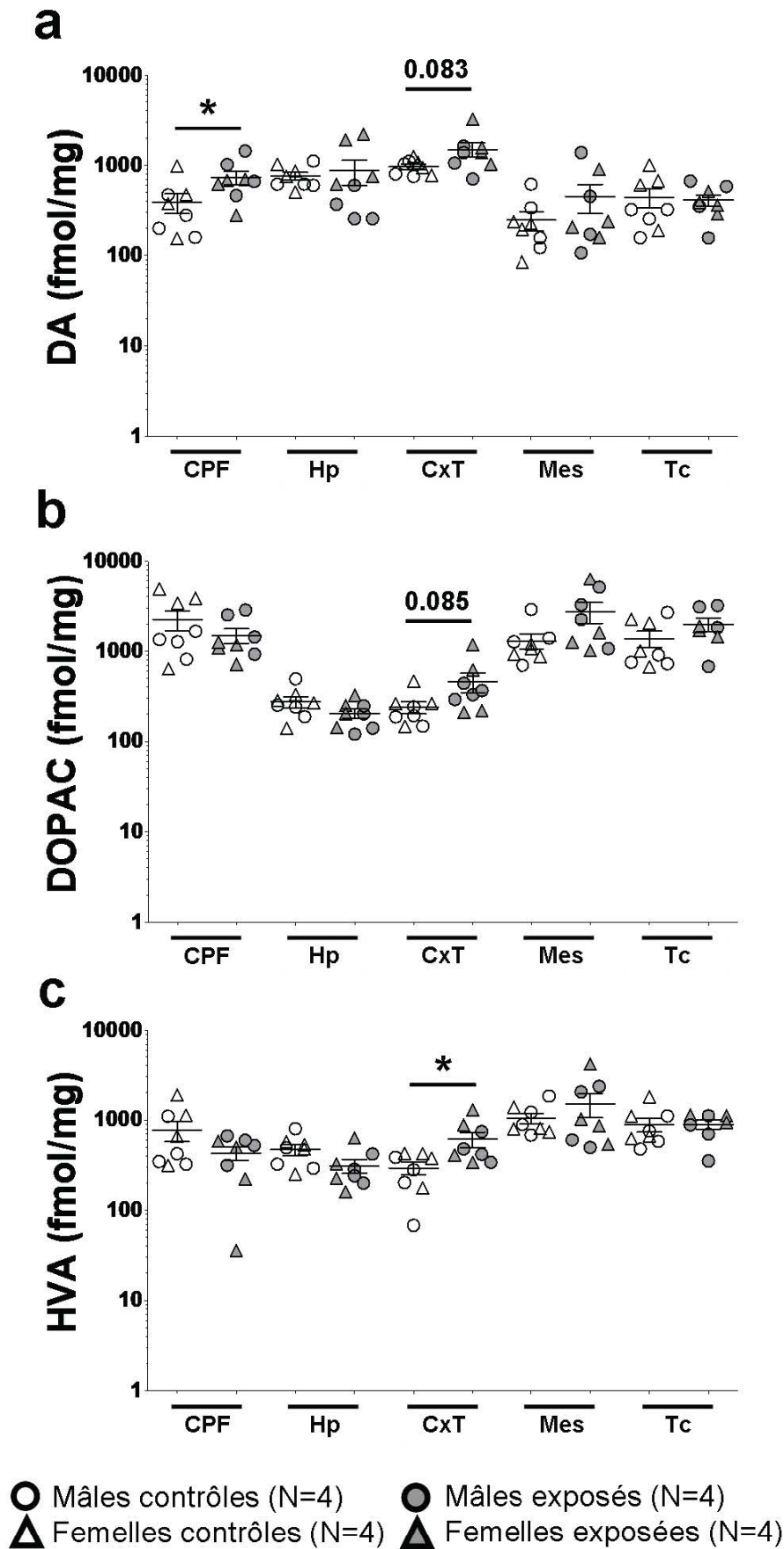


Figure C14 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système dopaminergique central des fœtus F1. Représentation graphique du niveau de DA (a.), de DOPAC (b.) et de HVA (c.) au niveau de diverses structures cérébrales chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **DA** : Dopamine ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HVA** : Acide homovanillique ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **Mes** : Mésencéphale ; **Tc** : Tronc cérébral.

2.2.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique

2.2.1.1. Approche neurochimique

L'analyse statistique a mis en évidence une augmentation significative de 89% des niveaux de dopamine dans le cortex préfrontal (CPF) chez les animaux exposés par rapport aux fœtus contrôles ($F_{(1,15)} = 7.045$, $p = 0.022$) (Figure C14a), modification qui n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.002$, $p = 0.962$). De façon intéressante, une interaction entre le type d'exposition et le sexe a été observée ($F_{(1,15)} = 7.166$, $p = 0.022$), avec une augmentation plus importante chez les mâles (222 %) que chez les femelles (15%) par rapport aux contrôles du même sexe.

L'analyse statistique au niveau de l'hippocampe (Hp) des niveaux de DA (Figure C14) n'a révélé aucun effet significatif lié à l'exposition aux PFD ($F_{(1,15)} = 0.240$, $p = 0.634$). Cependant, une différence liée au sexe ($F_{(1,15)} = 4.400$, $p = 0.060$) et une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition ont été observées ($F_{(1,15)} = 5.220$, $p = 0.043$), montrant une augmentation de 75% du niveau de DA chez les femelles exposées par rapport aux femelles contrôles et une diminution de 50% du niveau mesuré chez les mâles exposés par rapport aux mâles contrôles.

En ce qui concerne le cortex temporal, qui englobe aussi le cortex entorhinal (CxT), le niveau de DA des animaux issus de mères exposées est augmenté de 50% par rapport à celui des animaux issus de mères contrôles, bien que non significatif ($F_{(1,15)} = 3.636$, $p = 0.083$) (Figure C14a) ; aucune différence significative liée au sexe ($F_{(1,15)} = 1.696$, $p = 0.188$) ou mettant en évidence une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.418$, $p = 0.531$).

L'analyse statistique au niveau du tronc cérébral (Tc) n'a révélé aucun effet lié à l'exposition aux PFD ($F_{(1,15)} = 0.047$, $p = 0.833$) ou au sexe ($F_{(1,15)} = 1.869$, $p = 0.199$). En revanche, une tendance à l'interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition a été observée ($F_{(1,15)} = 3.419$, $p = 0.091$), qui se traduit par une diminution de 37% du niveau de DA chez les femelles exposées et une augmentation de 66% du niveau de DA chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Enfin, aucune différence significative n'a été observée au niveau du mésencéphale (Mes) (Figure C14a).

Concernant les niveaux de DOPAC (Figure C14b), l'analyse statistique au niveau du CPF n'a pas révélé d'effets liés à l'exposition ($F_{(1,15)} = 1.893$, $p = 0.196$) ou au sexe ($F_{(1,15)} = 1.076$, $p = 0.322$). En revanche, une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition a été observée ($F_{(1,15)} = 6.784$, $p = 0.024$), avec une diminution de 67% du niveau de DOPAC chez les femelles exposées et une augmentation de 52% du niveau de DOPAC chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

En ce qui concerne le CxT, une hausse de 91% du niveau de DOPAC des animaux issus de mères exposées par rapport à celui des fœtus contrôles a été observée, bien que non significative ($F_{(1,15)} = 3.569$, $p = 0.085$). Par contre, aucun effet

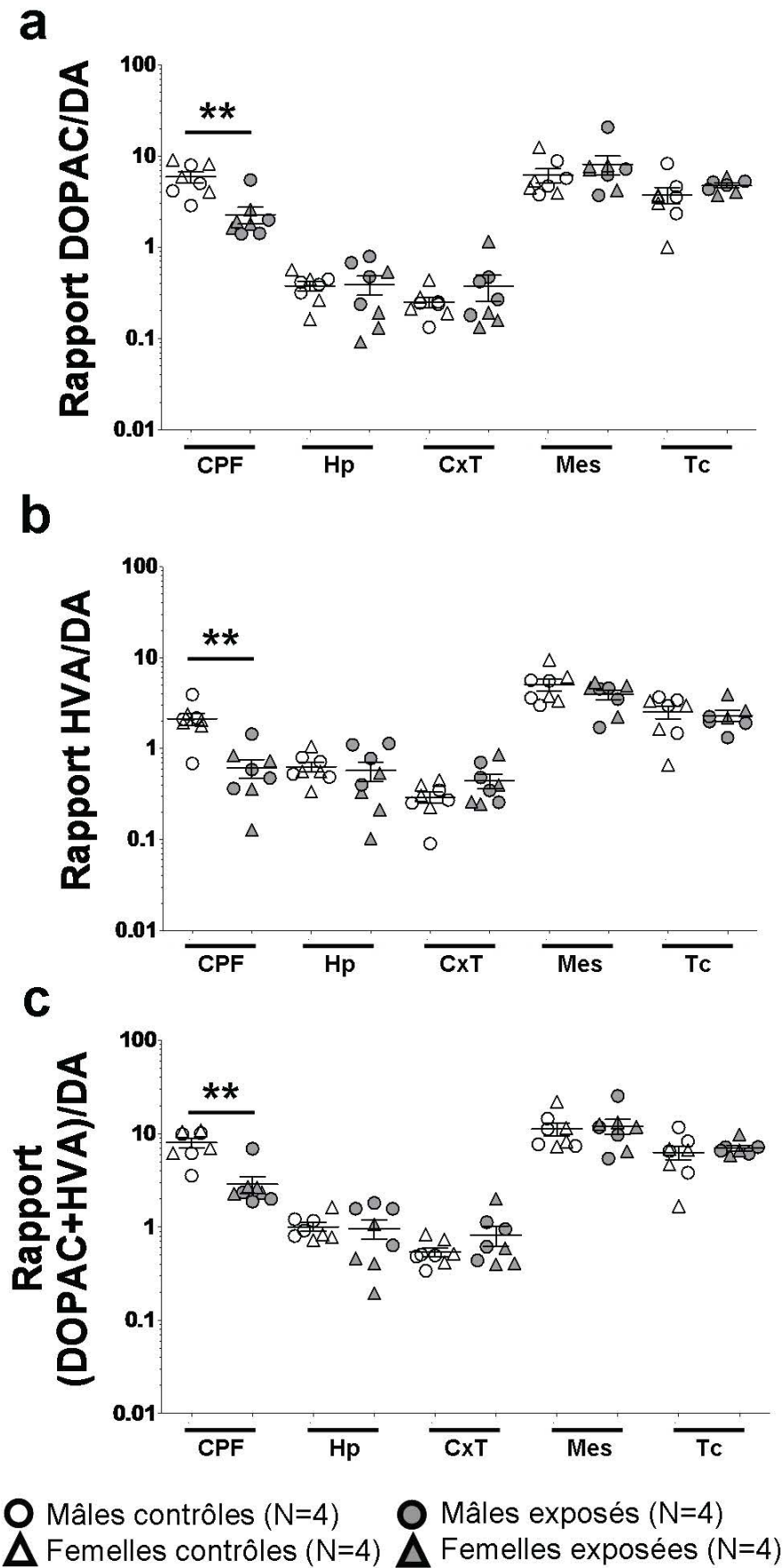


Figure C15 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les rapports dopaminergiques centraux chez des fœtus F1. Représentation graphique des rapports DOPAC/DA (a.), HVA/DA (b.) et (DOPAC+HVA)/DA (c.) au niveau de diverses structures cérébrales chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **DA** : Dopamine ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HVA** : Acide homovanillique ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **Mes** : Mésencéphale ; **Tc** : Tronc cérébral.

du sexe ($F_{(1,15)} = 0.887$, $p = 0.367$) ou de l'interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.756$, $p = 0.403$). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux sur le reste des structures analysées (tronc cérébral et mésencéphale) (Figure C14b).

En ce qui concerne les niveaux d'HVA (Figure C14c), une augmentation de 109% a été mesurée dans le CxT des animaux issus de lapines exposées par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,15)} = 5.782$, $p = 0.035$), modification qui n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 1.840$, $p = 0.202$) et qui ne résulte pas d'une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,15)} = 0.101$, $p = 0.757$). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux sur les autres structures analysées (tronc cérébral et mésencéphale) (Figure C14c).

Concernant le rapport DOPAC/DA (Figure C15a), l'analyse statistique des données obtenues au niveau du CPF a mis en évidence une diminution de 62% chez les animaux exposés par rapport aux contrôles ($F_{(1,15)} = 18.150$, $p = 0.001$) ; aucune différence n'est liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.002$, $p = 0.968$) ou résulte de l'interaction entre le sexe du fœtus et le type d'exposition ($F_{(1,15)} = 0.247$, $p = 0.629$). Enfin, aucune différence significative n'a été observée dans le tronc cérébral, le Mésencéphale, le CxT et le Hp.

L'analyse statistique du rapport HVA/DA calculé à partir des mesures faites dans le CPF (Figure C15b) a montré une diminution de 71% chez les fœtus exposés par rapport aux contrôles ($F_{(1,15)} = 15.693$, $p = 0.002$) ; cette baisse n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.375$, $p = 0.553$) et n'est pas liée à une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,15)} = 0.020$, $p = 0.890$).

Concernant le rapport HVA/DA au niveau de l'hippocampe (Figure C15b), l'analyse statistique n'a révélé aucun effet lié à l'exposition ($F_{(1,15)} = 0.171$, $p = 0.687$), alors que des tendances à un effet lié au sexe ($F_{(1,15)} = 4.027$, $p = 0.070$) ainsi qu'à l'interaction entre le sexe et l'exposition ont été observées ($F_{(1,15)} = 4.092$, $p = 0.068$), qui se traduisent par une diminution de 53% du rapport HVA/DA chez les femelles exposées par rapport aux femelles contrôles et une augmentation de 35% du rapport HVA/DA chez les mâles exposés par rapport aux mâles contrôles. Aucune différence significative n'a été observée sur les autres structures analysées (à savoir, le CxT, le Mes et le Tc).

Enfin, l'analyse statistique des valeurs du rapport (HVA+DOPAC)/DA calculé pour le CPF a mis en évidence une diminution de 64% chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,15)} = 23.134$, $p = 0.001$) (Figure C15c) ; cette diminution n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.035$, $p = 0.855$) ni à une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,15)} = 0.119$, $p = 0.736$).

Tableau C1. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système dopaminergique des fœtus F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
SNc	22.9 ± 1.51 (5)	24.0 ± 3.24 (4)	25.9 ± 3.42 (3)	24.4 ± 1.58 (4)	(1, 15)	0.664	0.439	0.035	0.854	0.425	0.528
SNr	5.0 ± 0.38 (5)	4.5 ± 0.65 (4)	5.7 ± 1.85 (3)	5.4 ± 0.87 (4)	(1, 15)	0.998	0.339	0.240	0.634	0.01	0.924
VTA	16.8 ± 2.80 (5)	24.3 ± 3.11 (4)	22.0 ± 3.88 (3)	21.1 ± 1.58 (4)	(1, 15)	0.151	0.705	1.372	0.266	2.674	0.130
Cd	17.3 ± 4.81 (5)	15.8 ± 4.35 (4)	12.2 ± 1.86 (4)	9.9 ± 1.21 (4)	(1, 16)	4.137	<u>0.065</u>	0.610	0.450	0.000	0.994
Put	21.0 ± 4.33 (5)	20.6 ± 3.13 (4)	18.2 ± 3.00 (4)	15.6 ± 1.53 (4)	(1, 16)	3.019	0.108	0.592	0.457	0.077	0.786
VP	18.2 ± 3.91 (5)	18.9 ± 4.67 (4)	14.2 ± 2.51 (4)	13.4 ± 1.50 (4)	(1, 16)	2.988	0.110	0.014	0.908	0.021	0.88
AcbC	15.4 ± 4.34 (5)	13.7 ± 4.45 (4)	10.4 ± 0.74 (4)	9.5 ± 0.98 (4)	(1, 16)	3.550	<u>0.084</u>	0.394	0.542	0.079	0.783
AcbS	18.3 ± 4.07 (5)	18.4 ± 4.57 (4)	13.8 ± 1.79 (4)	12.5 ± 0.74 (4)	(1, 16)	4.438	<u>0.057</u>	0.127	0.727	0.014	0.907
Pir	6.1 ± 1.82 (5)	3.3 ± 1.76 (4)	3.1 ± 0.84 (4)	2.4 ± 1.79 (4)	(1, 16)	1.664	0.221	1.308	0.275	0.506	0.491

Tous les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité relative ± ESM. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. **AcbC** : Noyau Accumbens, Core ; **AcbS** : Noyau Accumbens, Shell ; **Cd** : Noyau caudé ; **ddl** : Degrés de liberté ; **Pir** : Cortex piriforme ; **Put** : Putamen ; **SNc** : Substance noire pars compacta ; **SNr** : Substance noire pars compacta ; **VP** : Pallidum ventral ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale

Au niveau de l'hippocampe, aucun effet de l'exposition sur le rapport (DOPAC+HVA)/DA n'a été observé ($F_{(1,15)} = 0.040$, $p = 0.845$) (Figure C15c), tandis que des tendances à un effet du sexe ($F_{(1,15)} = 4.115$, $p = 0.067$) et de l'interaction entre le sexe du fœtus et le type d'exposition ($F_{(1,15)} = 4.568$, $p = 0.056$) sont à noter. Ces effets consistent en une diminution de 46 % chez les femelles exposées et une augmentation de 36% chez les mâles par rapport aux contrôles du même sexe. Au niveau des autres structures analysées (CxT, Mes et Tc), aucune différence significative n'a été observée.

2.2.1.2. Approche immunohistochimique

En absence d'atlas de lapin à l'époque, la quantification de l'intensité relative de marquage TH⁺ a été réalisée dans plusieurs régions centrales, repérées selon les coordonnées issues de l'atlas stéréotaxique du rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007) (Figures B8). La publication récente d'un atlas de lapereau, très proche de celui-là, ne donne pas lieu à des interprétations différentes de nos données (Schneider et al., 2018).

L'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence de l'intensité relative de marquage TH⁺ entre les deux groupes d'animaux au niveau de la substance noire (SN) et de l'aire tegmentale ventrale (VTA) (principaux sièges de production dopaminergiques) (Tableau C1).

Au niveau du noyau caudé (Cd), les résultats montrent une tendance à la diminution de l'intensité relative du marquage TH⁺ chez les animaux issus de mères exposées par rapport aux valeurs obtenues avec des animaux issus de mères contrôles ($F_{(1,16)} = 4.137$, $p = 0.065$) ; cette tendance n'est pas liée au sexe ($F_{(1,16)} = 0.610$, $p = 0.450$) et ne résulte pas d'une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,16)} = 0.000$, $p = 0.994$) (Tableau C1).

Concernant le noyau Accumbens (Acb), nous avons divisé cette structure en deux parties, le noyau (Core, AcbC) et la coquille (Shell, AcbS), en raison de leurs différences morphologiques et fonctionnelles. Une tendance à une diminution de l'intensité relative de marquage TH⁺ dans le AcbC des animaux issus de mères exposées a été observée ($F_{(1,16)} = 3.550$, $p = 0.084$) ; cette modification n'est pas liée au sexe ($F_{(1,16)} = 0.394$, $p = 0.542$) et ne met pas en évidence d'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,16)} = 0.079$, $p = 0.783$) (Tableau C1). Le même profil a été observé au niveau de la coquille (AcbS) (**exposition** : $F_{(1,16)} = 4.438$, $p = 0.057$; **sexe** : $F_{(1,16)} = 0.127$, $p = 0.727$; **interaction** : $F_{(1,16)} = 0.014$, $p = 0.907$) (Tableau C1). Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux au niveau du putamen (Put), du pallidum ventral (VP) et du cortex piriforme (Tableau C1). Les signaux issus des septums latéraux dorsaux, latéral intermédiaire et médian (LSD, LSI et MS, respectivement) et du cortex cingulaire (Cg) étaient trop faibles par rapport au bruit de fond pour être quantifiés.

Tableau C2. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE des fœtus F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
SNc	5.4 ± 0.70 (3)	5.4 ± 0.52 (4)	4.9 ± 1.03 (3)	5.2 ± 0.34 (4)	(1, 13)	0.351	0.568	0.097	0.763	0.081	0.782
SNr	3.7 ± 0.59 (3)	2.7 ± 0.45 (4)	2.9 ± 0.81 (3)	3.4 ± 0.24 (4)	(1, 13)	0.10	0.923	0.319	0.586	2.801	0.129
VTA	5.1 ± 0.53 (3)	5.2 ± 0.27 (4)	5.3 ± 0.32 (3)	4.9 ± 0.39 (4)	(1, 15)	0.032	0.861	0.156	0.702	0.599	0.459
Cd	6.2 ± 0.34 (5)	4.8 ± 0.34 (4)	5.9 ± 0.76 (4)	4.8 ± 0.56 (4)	(1, 16)	0.160	0.696	7.382	0.019 *	0.189	0.671
Put	10.5 ± 0.49 (5)	8.2 ± 1.07 (4)	9.4 ± 0.82 (4)	8.1 ± 0.92 (4)	(1, 16)	0.679	0.426	6.540	0.025*	0.583	0.460
VP	8.3 ± 1.21 (5)	7.0 ± 0.33 (4)	7.7 ± 0.71 (4)	7.7 ± 1.16 (4)	(1, 15)	0.005	0.947	0.497	0.495	0.425	0.528
AcbC	4.5 ± 0.34 (5)	3.7 ± 0.55 (4)	3.8 ± 0.38 (4)	3.1 ± 0.45 (4)	(1, 16)	3.186	0.100	4.431	<u>0.057</u>	0.012	0.914
AcbS	7.4 ± 1.12 (5)	7.8 ± 2.29 (4)	6.2 ± 1.61 (4)	5.3 ± 0.86 (4)	(1, 16)	2.327	0.153	0.060	0.811	0.199	0.664
Pir	2.2 ± 0.36 (5)	1.5 ± 0.56 (4)	1.9 ± 0.45 (4)	1.6 ± 0.31 (4)	(1, 16)	0.200	0.663	1.593	0.231	0.509	0.489
LSD	3.5 ± 1.12 (3)	2.6 ± 0.55 (3)	3.3 (1)	2.7 ± 0.31 (4)	(1, 10)	0.371	0.565	0.371	0.565	0.292	0.609
LSI	3.7 ± 0.49 (4)	2.7 ± 0.36 (4)	3.4 ± 0.36 (4)	2.8 ± 0.35 (4)	(1, 15)	0.301	0.595	7.476	0.019 *	0.497	0.495
MS	9.5 ± 0.68 (4)	8.7 ± 0.96 (4)	8.5 ± 0.88 (4)	7.5 ± 0.81 (4)	(1, 15)	2.347	0.154	1.430	0.257	0.012	0.914
Ld	10.1 ± 1.51 (4)	8.1 ± 1.68 (3)	9.0 ± 1.27 (3)	8.5 ± 1.69 (2)	(1, 11)	0.245	0.636	1.087	0.332	0.186	0.679
HdB	14.4 ± 0.62 (4)	11.1 ± 1.70 (4)	10.8 ± 0.74 (3)	11.5 ± 0.64 (4)	(1, 14)	2.660	0.134	1.919	0.196	4.018	<u>0.070</u>
B	16.1 ± 0.63 (5)	14.7 ± 1.44 (4)	14.4 ± 0.87 (3)	13.3 ± 1.78 (4)	(1, 16)	1.946	0.188	1.390	0.261	0.011	0.917
MCPO /LOT1	15.0 ± 0.71 (3)	15.1 ± 0.36 (4)	16.5 ± 0.64 (3)	15.3 ± 1.88 (4)	(1, 13)	0.522	0.488	0.254	0.626	0.369	0.559
ThV	7.7 ± 0.71 (4)	7.1 ± 0.90 (4)	7.5 ± 0.63 (4)	6.1 ± 1.07 (4)	(1, 15)	0.519	0.486	1.425	0.258	0.344	0.569

Tous les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu équivalent $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. . **AcbC** : Noyau Accumbens, Core ; **AcbS** : Noyau Accumbens, Shell ; **B** : Noyau basal de Meynert ; **Cd** : Noyau caudé ; **ddl** : Degrés de liberté ; **HdB** : Bande diagonale horizontale de Broca ; **Ld** : Zone septale lambdoïde ; **LSD** : Septum latéral dorsal ; **LSI** : Septum latéral intermédiaire ; **MCPO/LOT1** : Noyau préoptique magnocellulaire/Noyau latéral du tractus olfactif, couche 1 ; **MS** : Septum médian ; **Pir** : Cortex piriforme ; **Put** : Putamen ; **SNc** : Substance noire pars compacta ; **SNr** : Substance noire pars compacta ; **ThV** : Thalamus ventral ; **VP** : Pallidum ventral ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale.

Le marquage TH⁺ a été complété par une étude histochimique de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), prise comme un indicateur de l'intégrité des circuits neuronaux (Figure B11).

Au niveau de la SN et de la VTA, aucune différence significative de l'activité AChE entre les deux groupes d'animaux n'a été décelée (Tableau C2).

L'analyse statistique de l'activité AChE au niveau du Cd n'a pas révélé de différence significative liée à l'exposition ($F_{(1,16)} = 0.160$, $p = 0.696$) (Tableau C2), alors qu'une différence liée au sexe a été observée ($F_{(1,16)} = 7.382$, $p = 0.019$). Par contre, aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée pour cette activité ($F_{(1,16)} = 0.189$, $p = 0.671$) dans cette région.

Au niveau du Put, l'analyse statistique de l'AChE n'a pas mis en évidence d'effet lié à l'exposition ($F_{(1,16)} = 0.679$, $p = 0.426$) ou à l'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,16)} = 0.583$, $p = 0.460$) (Tableau C2). En revanche, on note des différences liées au sexe ($F_{(1,16)} = 6.540$, $p = 0.025$).

L'analyse statistique de l'activité de cette enzyme au niveau du AcbC n'a pas révélé de différence significative liée à l'exposition ($F_{(1,16)} = 3.186$, $p = 0.100$) (Tableau C2). En revanche, une tendance à des différences liées au sexe a été observée ($F_{(1,16)} = 4.431$, $p = 0.057$). Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,16)} = 0.012$, $p = 0.914$).

Dans le septum latéral intermédiaire (LSI), aucune différence significative liée à l'exposition ($F_{(1,15)} = 0.301$, $p = 0.595$) ou à l'interaction entre le type d'exposition et le sexe n'est à noter ($F_{(1,15)} = 0.497$, $p = 0.495$) (Tableau C2). En revanche, des différences liées au sexe ont été constatées ($F_{(1,15)} = 7.476$, $p = 0.019$), les femelles présentant des niveaux plus faibles que les mâles.

Au niveau de la Bande diagonale horizontale de Broca (HdB) (Tableau C2), l'exposition et le sexe n'ont pas induit de variations significatives de l'activité de l'enzyme (**exposition** : $F_{(1,14)} = 2.660$, $p = 0.134$; **sexe** : $F_{(1,14)} = 1.919$, $p = 0.196$). En revanche, une tendance relative à l'interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition a été observée ($F_{(1,14)} = 4.018$, $p = 0.070$), liée à une diminution de 24% de l'activité AChE chez les mâles exposés, alors qu'aucune variation n'a été observée chez les femelles (augmentation de 3%).

Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux au niveau des autres structures analysées (Tableau C2).

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration tissulaire de dopamine au niveau cortical (CPF et CxT) suite à l'exposition aux PFD, tandis que les effets au niveau hippocampique se sont avérés être sexe-dépendants, avec une augmentation chez les femelles exposées et une diminution chez les mâles exposés. Une tendance à des modifications sexe-dépendantes suite à l'exposition aux PFD des niveaux de DA a également été observée au niveau du Tc avec, dans ce cas, une diminution chez les femelles exposées et une augmentation chez

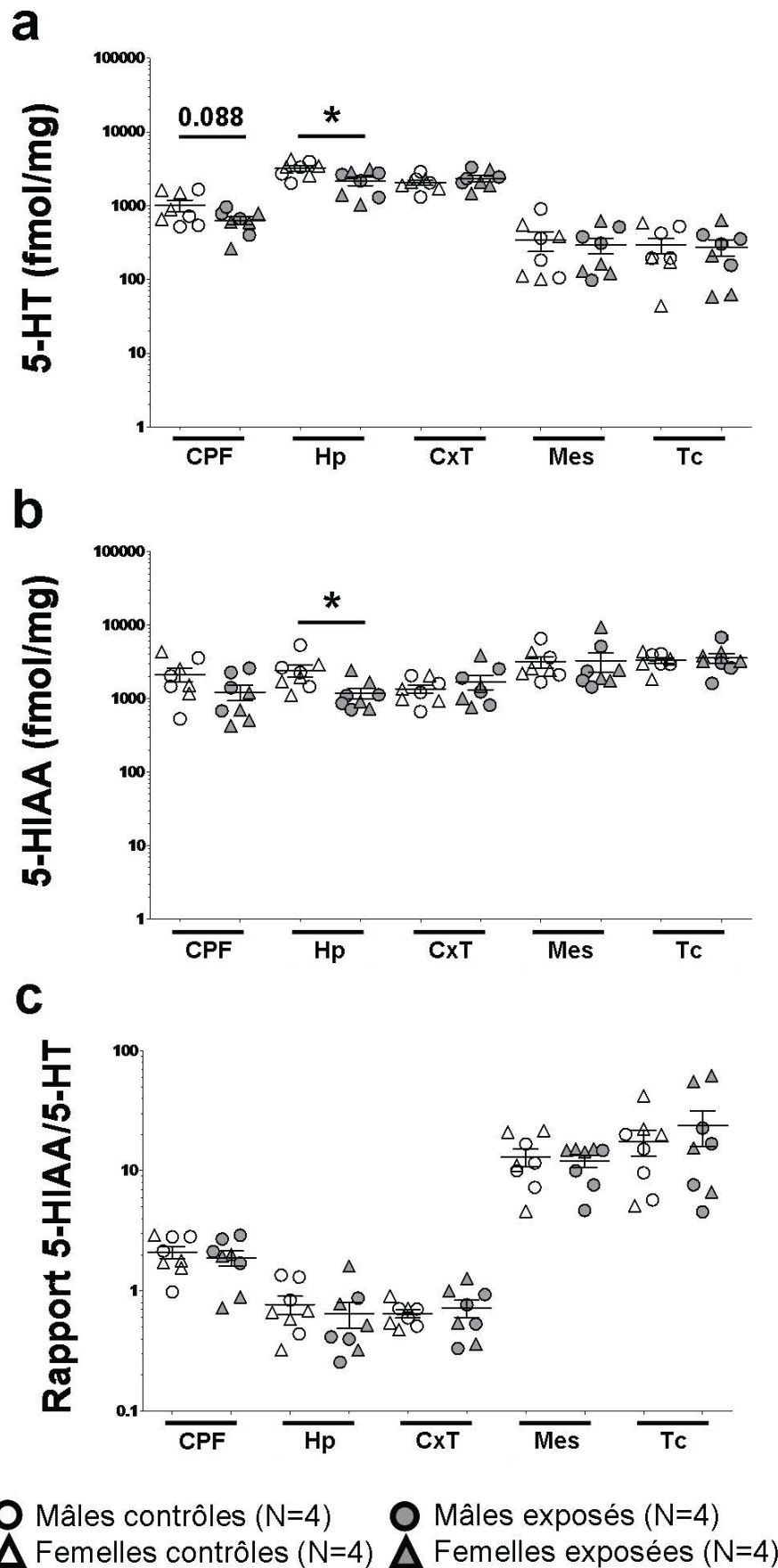


Figure C16 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système sérotoninergique central des fœtus F1. Représentation graphique du niveau de 5-HT (a.), de 5-HIAA (b.) et du rapport 5-HIAA/5-HT (c.) au niveau de diverses structures cérébrales chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **5-HT** : Sérotonine ; **5-HIAA** : 5-hydroxyindolacétique ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **Mes** : Mésencéphale ; **Tc** : Tronc cérébral.

les mâles exposés. De plus, il a été observé une tendance à la diminution des niveaux dopaminergiques au niveau du Cd et de l'Acb (révélés ici au travers de l'enzyme limitante TH). L'ensemble de ces observations va dans le sens d'une possible dérégulation des voies dopaminergiques striatales, sans pour autant affecter de façon significative l'intégrité des circuits neuronaux étudiés ici (mis en évidence par le marquage AChE).

2.2.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique

2.2.2.1. Approche neurochimique

L'analyse statistique montre une tendance à la diminution de 38% du niveau de 5-HT chez les animaux exposés par rapport aux fœtus contrôles dans le cortex préfrontal (CPF) ($F_{(1,15)} = 3.499$, $p = 0.088$) (Figure C16a) ; aucune différence liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.158$, $p = 0.699$) ou mettant en évidence une interaction entre le sexe du fœtus et le type d'exposition n'a été observée ($F_{(1,15)} = 1.104$, $p = 0.316$).

Au niveau de l'hippocampe (Hp), l'analyse statistique a mis en évidence une diminution de 33% du niveau de 5-HT chez les animaux issus de mères exposées par rapport à ceux nés de mères contrôles ($F_{(1,15)} = 6.022$, $p = 0.032$) (Figure C16a); cette altération n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.090$, $p = 0.769$) et ne met pas en évidence d'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,15)} = 0.315$, $p = 0.586$) (Figure C16a). En ce qui concerne les autres structures analysées (CxT, Mes et Tc), aucune différence des niveaux de sérotonine n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (Figure C16a).

En ce qui concerne l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) qui est le métabolite principal de la 5-HT, l'analyse statistique des résultats obtenus dans l'Hp a mis en évidence une diminution de 51% chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux contrôles ($F_{(1,15)} = 6.333$, $p = 0.029$) ; cette diminution n'est pas liée au sexe ($F_{(1,15)} = 0.070$, $p = 0.796$) et ne résulte pas d'une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,15)} = 1.154$, $p = 0.306$) (Figure C16b). En ce qui concerne les autres structures analysées (le cortex préfrontal (CPF) ; le cortex temporal/entorhinal (CxT) ; le Mésencéphale (Mes) et le Tronc cérébral (Tc)), aucune différence du niveau de 5-HIAA n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (Figure C16b).

Concernant le rapport 5-HIAA/5-HT, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux pour l'ensemble des structures analysées (Figure C16c).

2.2.2.2. Approche immunohistochimique

La quantification de l'intensité relative de marquage TrpH⁺ au niveau des noyaux du Raphé (siège principal de production sérotoninergique) a été réalisée en se basant également sur l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007) (Figure B9).

Tableau C3. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système sérotoninergique des fœtus F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
DRD	25.6 ± 2.39 (3)	31.0 ± 10.32 (2)	20.1 ± 2.98 (3)	25.8 ± 3.67 (4)	(1, 11)	3.254	0.114	3.587	0.100	0.125	0.735
DRV	26.3 ± 4.12 (3)	23.4 ± 10.06 (2)	17.1 ± 3.32 (4)	23.6 ± 3.83 (4)	(1, 12)	2.218	0.175	0.542	0.483	2.391	0.161
Cli	29.9 ± 2.71 (3)	17.7 (1)	20.1 ± 1.74 (4)	23.6 ± 3.87 (4)	(1, 11)	0.745	0.417	1.086	0.332	7.070	0.033 *
Rbd	25.8 ± 4.00 (3)	21.1 ± 4.93 (4)	18.2 ± 2.76 (4)	22.9 ± 1.40 (4)	(1, 14)	0.915	0.361	0.000	0.996	2.328	0.158
MnR	22.9 ± 7.92 (3)	20.8 ± 4.44 (4)	18.4 ± 3.72 (4)	21.4 ± 3.83 (4)	(1, 14)	0.331	0.578	0.002	0.961	0.519	0.488
PMnR	18.1 ± 3.35 (2)	11.3 ± 4.54 (3)	11.4 ± 2.04 (4)	13.3 ± 3.21 (4)	(1, 12)	1.096	0.326	0.230	0.644	1.639	0.236
BOin	25.9 ± 3.46 (3)	23.5 ± 4.49 (4)	18.8 ± 2.75 (4)	23.6 ± 3.39 (4)	(1, 14)	1.389	0.266	0.112	0.744	1.513	0.247
N.Rh	25.7 ± 3.39 (3)	20.9 ± 4.70 (4)	18.3 ± 2.33 (4)	21.8 ± 2.32 (4)	(1, 14)	2.716	0.130	0.002	0.969	3.975	<u>0.074</u>

Tous les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité relative ± ESM. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. **BOin** : Ensemble MnR+DRD ; **Cli** : Noyau du Raphé caudal linéaire ; **ddl** : Degrés de liberté ; **DRD** : Noyau Dorsal du Raphé ; **DRV** : Noyau ventral du Raphé ; **MnR** : Noyau du Raphé médian ; **N.Rh** : Noyaux du Raphé **PMnR** : Noyau du Raphé paramédian ; **Rbd** : Noyau rhabdoïde.

Tableau C4. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE au niveau du tronc cérébral des fœtus F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
Ptg	9.2 ± 0.42 (4)	8.3 ± 1.48 (3)	8.5 ± 1.01 (4)	9.0 ± 0.96 (4)	(1, 14)	0.001	0.972	0.043	0.840	0.810	0.389
Mitg/PBG	11.1 ± 0.58 (4)	10.2 ± 0.70 (4)	10.6 ± 1.13 (4)	10.1 ± 1.20 (4)	(1, 15)	0.664	0.439	0.035	0.854	0.425	0.528
Rbd	8.1 ± 0.45 (4)	6.7 ± 1.21 (4)	7.3 ± 0.66 (3)	6.4 ± 0.56 (4)	(1, 15)	0.998	0.339	0.240	0.634	0.01	0.924
4N	15.3 ± 0.69 (4)	13.6 ± 1.11 (3)	12.9 ± 1.94 (4)	12.6 ± 1.25 (2)	(1, 15)	0.151	0.705	1.372	0.266	2.674	0.130

Tous les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité relative ± ESM. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. **4N** : Nerf trochléaire ; **ddl** : Degrés de liberté ; **Mitg/PBG** : Noyau tegmental microcellulaire/Noyau parabigéminale ; **Ptg** : Noyau pédonculopontin ; **Rbd** : Noyau rhabdoïde.

Concernant la quantification de l'intensité de marquage TrpH⁺ du noyau du Raphé caudal linéaire (Cli), l'analyse statistique n'a pas mis en évidence d'effet lié à l'exposition ($F_{(1,11)} = 0.745$, $p = 0.417$) ou au sexe ($F_{(1,11)} = 1.086$, $p = 0.332$). En revanche, une interaction entre les deux facteurs a été observée dans cette structure ($F_{(1,11)} = 7.070$, $p = 0.033$), reflétée par une augmentation de 33% chez les femelles exposées et une diminution de 33% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe (Tableau C3). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux au niveau des autres noyaux du Raphé analysés qui sont (entre autres) le noyau Dorsal (DRD), le noyau ventral (DRV), le noyau rhabdoïde (Rbd) ; le noyau médian (MnR) et le noyau paramédian (PMnR) (Tableau C3).

Etant donné que l'innervation sérotoninergique bulbaire provient des fibres issues des noyaux médian et dorsal du Raphé (MnR et DRD, respectivement) (Doty et al, 2012a ; Steinfeld et al, 2015), nous avons rassemblé les valeurs d'intensité obtenues dans ces deux structures pour mettre en évidence des possibles altérations de l'ensemble de cette « voie sérotoninergique bulbaire, » ; pour autant, l'analyse statistique de l'intensité du marquage TrpH⁺ de l'ensemble MnR+DRD (BOin) n'a pas révélé de différence significative entre les deux groupes d'animaux (Tableau C3). Il est à noter que, en raison de difficultés techniques, le faible échantillonnage des femelles contrôles n'a pas permis d'exploiter les possibles altérations liées au sexe entre les fœtus dans les structures d'intérêt.

Finalement, l'analyse statistique de l'intensité de marquage TrpH⁺ de l'ensemble des noyaux du Raphé n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition aux PFD ($F_{(1,14)} = 2.716$, $p = 0.130$) ou liée au sexe ($F_{(1,14)} = 0.002$, $p = 0.969$) (Tableau C3). En revanche, nous avons observé une interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition ($F_{(1,14)} = 3.975$, $p = 0.074$), montrant une diminution de 29% de l'intensité chez les mâles exposés par rapport au mâles contrôles, alors qu'aucune variation importante (augmentation de 4%) n'a été observée entre les femelles des deux groupes.

L'étude immunohistochimique visant la TrpH a également été réalisée dans les mêmes régions centrales que pour la dopamine, mais les valeurs d'intensité de marquage se sont avérées faibles et non-spécifiques. L'analyse quantitative n'a donc pas pu être réalisée.

Le marquage TrpH⁺ a été complété par une étude histochimique de l'activité AchE. Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux dans l'ensemble des structures analysées (Tableau C4).

L'ensemble de ces résultats met en évidence une diminution des niveaux sérotoninergiques préfrontaux et hippocampiques des fœtus F1 exposés. L'effet de l'exposition aux PFD des niveaux de 5-HT (révélés ici au travers de l'enzyme limitante TrpH) dans les noyaux du Raphé s'est avéré sexe-dépendants, avec une augmentation

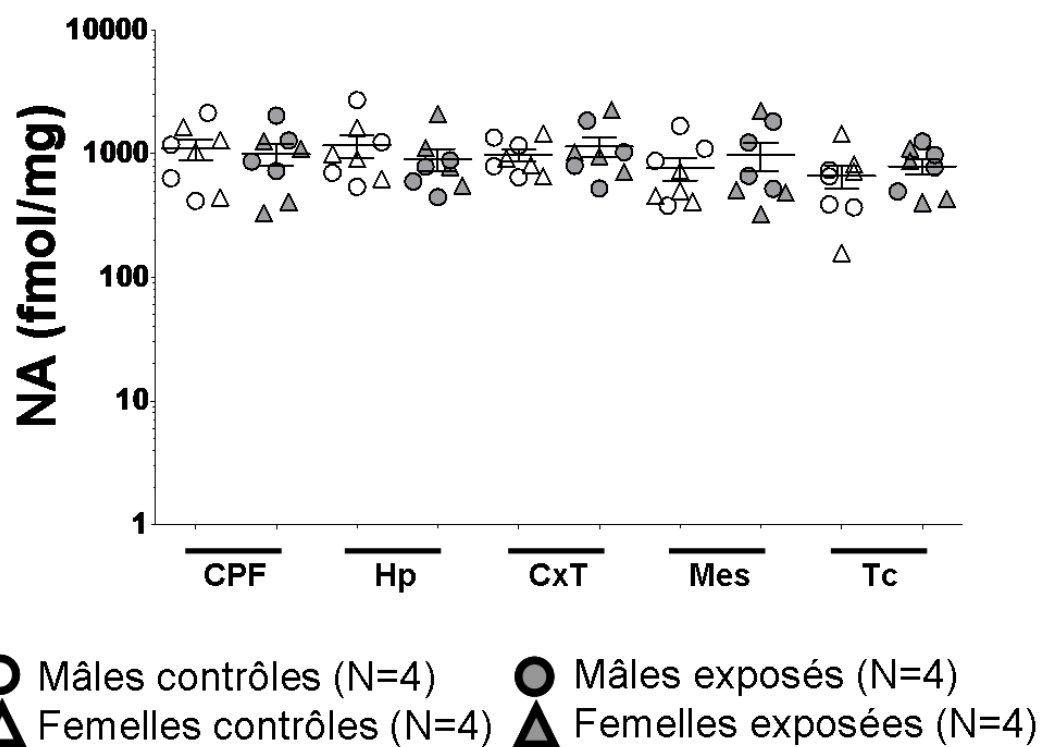


Figure C17 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le niveau de NA central chez des fœtus F1. Représentation graphique du niveau de NA au niveau de diverses structures cérébrales chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N=4 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **NA** : Noradrénaline ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **Mes** : Mésencéphale ; **Tc** : Tronc cérébral.

chez les femelles exposées et une diminution chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe. Cependant, ces résultats restent difficiles à interpréter quant aux possibles dérégulations de cette voie étant donné que le marquage TrpH⁺ au niveau des autres régions d'intérêt n'a pas pu être exploité.

2.2.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique

Concernant ce système, seule une approche neurochimique a pu être réalisée. L'analyse statistique des données obtenues au niveau du tronc cérébral (Tc) (Figure C17) n'a révélé aucun effet significatif lié à l'exposition aux PFD ($F_{(1,15)} = 1.602$, $p = 0.232$) ou au sexe ($F_{(1,15)} = 1.221$, $p = 0.293$). En revanche, une tendance à l'interaction entre le sexe du fœtus et l'exposition a été observée ($F_{(1,15)} = 3.328$, $p = 0.095$), reflétée par une diminution de 45% du niveau de NA chez les mâles par rapport aux contrôles du même sexe tandis que les valeurs restent comparables entre les deux groupes de femelles. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux sur le reste des structures analysées (Figure C17).

L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans l'encadré 10.

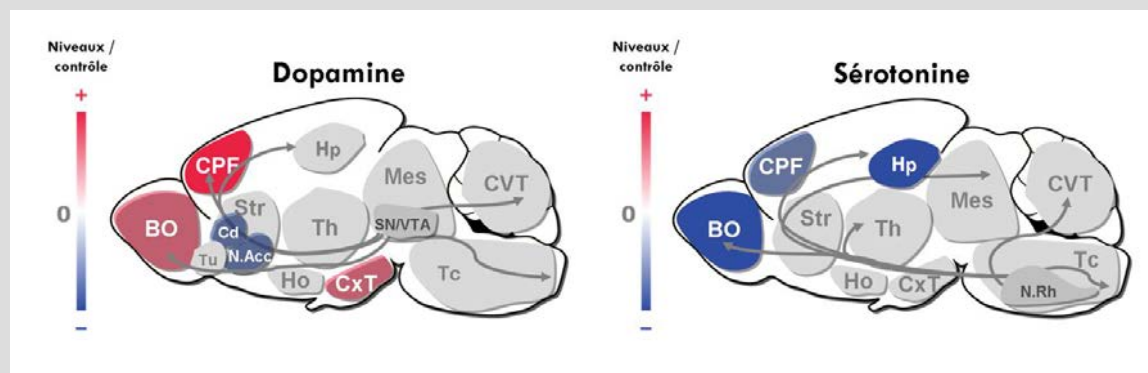
Encadré 10 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur les systèmes neuromodulateurs des fœtus de la génération F1

Afin d'établir un lien entre les perturbations anatomiques et neurochimiques observées au niveau du système olfactif, une étude de la **neuromodulation centrale** via des approches *neurochimiques* et *immunohistochimique* a été réalisée.

Les résultats obtenus font apparaître des dérégulations importantes des dérégulations importantes des **voies sérotoninergique et dopaminergique** chez les fœtus F1 exposés.

Il est à noter que des **modifications antagonistes** du taux tissulaire de 5-HT ont été mis en évidence dans les régions où des modifications concomitantes de la DA ont été observées, suggérant une **relation intrinsèque** entre les deux systèmes dans ces différentes régions.

Concernant le **système noradrénergique**, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux.



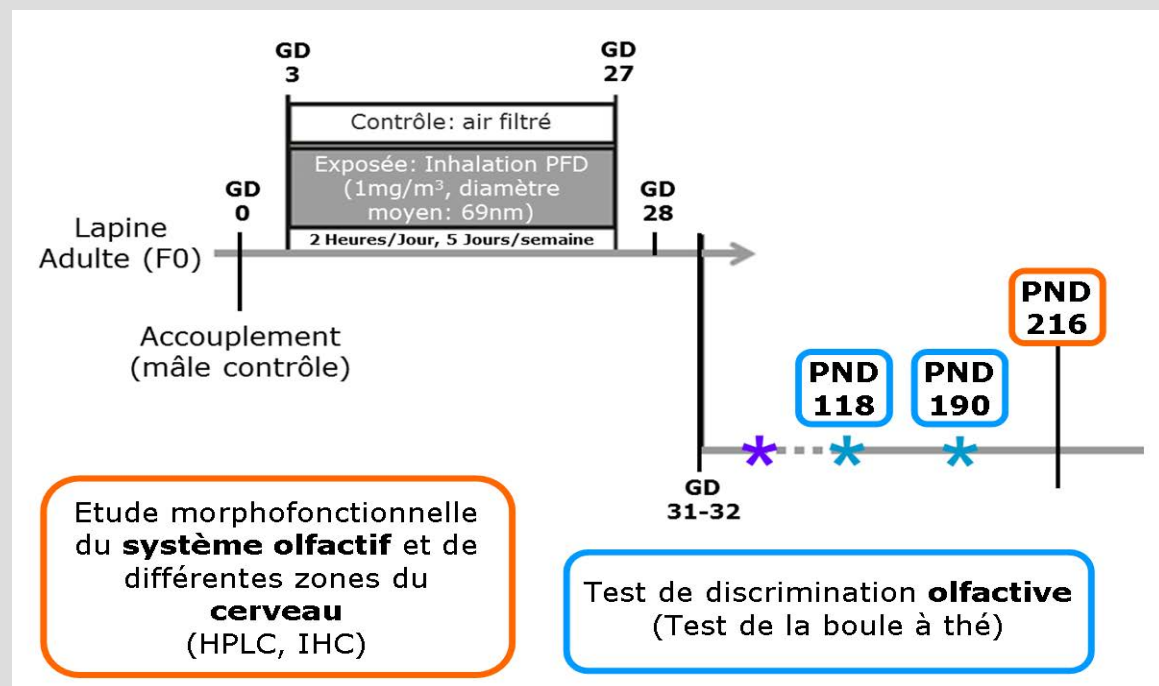
Présentation schématique des résultats obtenus sur les systèmes dopaminergique et sérotoninergique fœtaux.
N.Acc : Noyau Accumbens ; **BO** : Bulbe Olfactif ; **Cd** : Caudé ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **N.Rh** : Noyaux du Raphé ; **SN/VTA** : Substance noire/ Aire tegmentale Ventrale ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus ; **Tu** : Tubercule olfactif. Image inspirée de [Dos Santos Coura & Granon, 2012](#).

Encadré 11 : Etude des conséquences à long terme d'une exposition gestationnelle aux PFD

La neurotoxicité des PFD sur la **mise en place et la préservation** anatomo-fonctionnelle des circuits neuronaux centraux et périphériques à long terme a été évaluée sur deux grands axes :

Un axe *in vivo*, qui s'intéresse à l'évaluation de la *capacité de discrimination olfactive* des mâles au sevrage (**PND118**) et à l'âge adulte (**PND190**) en réponse à la présentation d'une boule métallique vide et d'une boule métallique remplie de foin (considéré comme étant une odeur alimentaire hédonique pour le lapin), et ainsi établir si d'éventuelles modifications précoces de la sensibilité olfactive (**PND2**) persistent à l'âge adulte.

Un axe *post-mortem*, qui s'intéresse, *via* des approches biochimiques et histologiques, à la possible persistance à l'âge adulte (**PND216**) des modifications des circuits neuronaux centraux et périphériques observées au stade fœtal (**GD28**).



Partie II – Effets neurotoxiques à long terme d’une exposition gestationnelle répétée aux particules de fumée de diesel

<u>1</u>	Etude sur le système olfactif adulte et le comportement olfactif à long terme	100
<u>2</u>	Etude sur le système nerveux central des adultes	110

Afin d’apporter quelques éléments de réponse quant aux possibles conséquences à long terme des altérations observées au stade périnatal et nous renseigner sur la plasticité cérébrale et les mécanismes d’adaptation mis en place au cours de la vie, nous avons effectué un suivi comportemental des animaux mâles à deux stades de développement, à savoir à trois (PND118) et six mois (PND190) en examinant leur sensibilité olfactive. De plus, des données morphométriques, neurochimiques ont été obtenues suite à la mise à mort des animaux, à PND216 (Encadré 11).

Il s’agira dans cette deuxième partie de présenter, dans un premier temps, les résultats obtenus sur le système olfactif en suivant la chronologie du modèle animal ; puis, dans un deuxième temps, les données obtenues au niveau du système nerveux central puis d’aborder, au niveau de la section conclusive, la plasticité à long terme du continuum anatomo-fonctionnel sous l’effet de l’exposition gestationnelle aux PFD à l’âge adulte. Dans ce chapitre, et par souci de facilité de lecture, nous appellerons « contrôles » les animaux nés de mère contrôles et « exposés » les animaux nés de mères exposées.

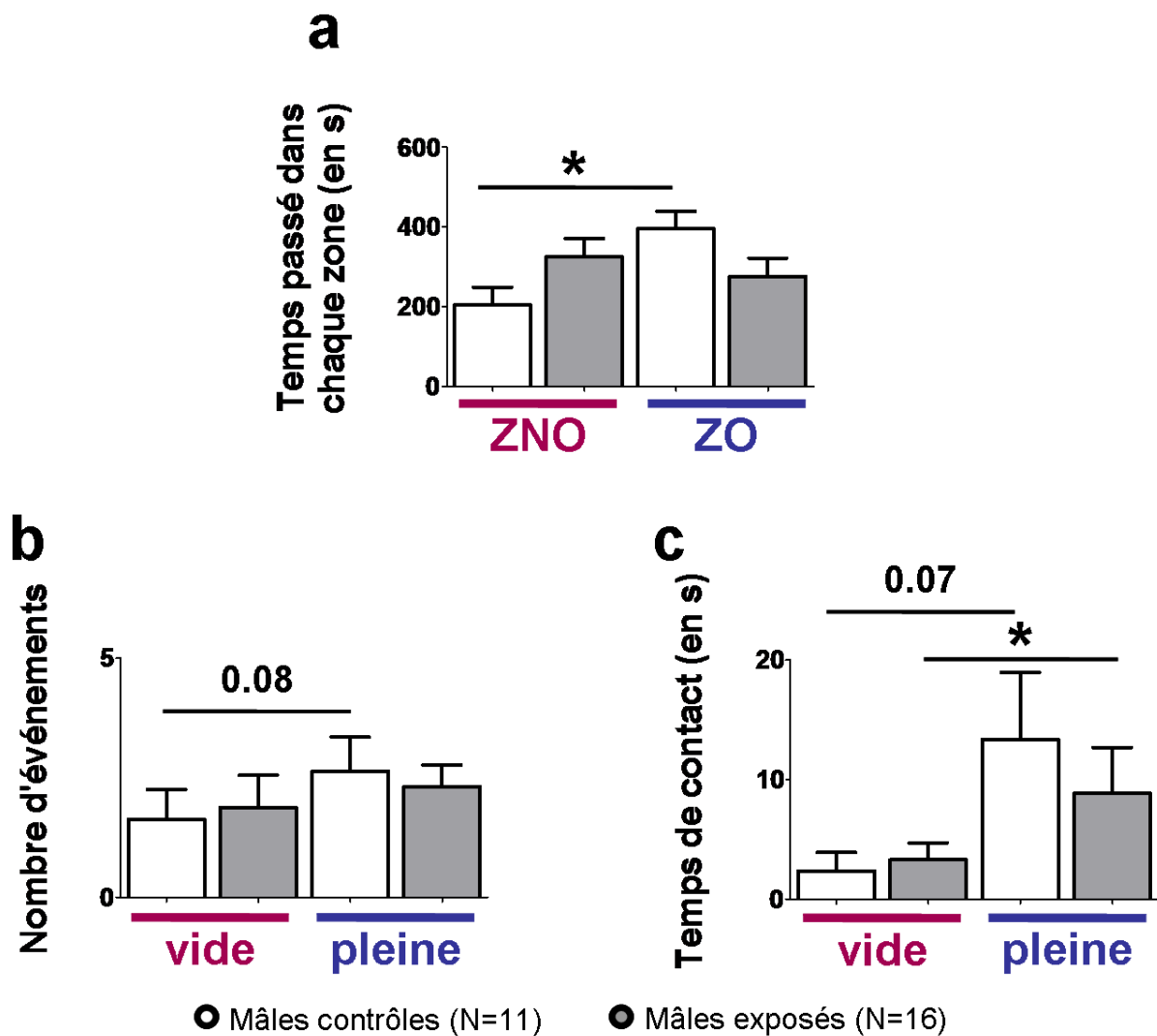


Figure C18 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND118. a. Temps (en secondes) passé dans la zone « non-odorisée » (ZNO) et dans la zone « odorisée » (ZO). **b.** Nombre de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). **c.** Temps de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=11 mâles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=16 mâles, en gris) sont exprimés en moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

1. Étude sur le système olfactif et le comportement olfactif à long terme

1.1. Analyse de la discrimination olfactive chez le mâle

Afin de mettre en évidence un lien possible entre les perturbations périnatales et d'éventuelles modifications de la perception olfactive à plus long terme, les animaux nés de mères contrôles ou exposés ont été évalués à PND118 et PND190 dans un test de discrimination olfactive nommé « test de la boule à thé ». Ce test a été adapté d'un test pratiqué dans l'unité NBO chez le rat (Prudhomme et al., 2009 ; Badonnel et al, 2012) et consiste à étudier la capacité de l'animal à discriminer au plan olfactif une boule à thé métallique vide et une boule à thé métallique remplie avec du foin (considéré ici comme une odeur alimentaire hédonique). Ce test a été réalisé sur deux jours consécutifs : d'abord avec les animaux en conditions d'élevage standard ; puis, après une période de jeûne de 16h à PND118 (B§1.1.1), puis, dans les mêmes conditions à PND190 (B§1.1.2) pour suivre l'évolution des performances olfactives. Seuls les mâles ont été testés pour des raisons de disponibilité des animaux.

1.1.1. Analyse de la discrimination olfactive à PND118 en condition standard d'élevage

1.1.1.1. Activité locomotrice et préférence de place

Les analyses statistiques n'ont révélé aucun effet significatif de l'exposition aux PFD sur le nombre total de déplacements entre la zone où se trouve la boule remplie de foin (ZO) et celle où est localisée la boule vide (ZNO) (8.7 ± 1.4 passages pour les animaux contrôles et 6.9 ± 1.6 passages pour les animaux exposés; $U=66.00$, $p=0.2843$). En ce qui concerne le comportement de préférence de place, reflété par le temps passé dans chaque zone, les résultats montrent que les animaux contrôles ont une préférence significative pour la ZO ($ZNO=204.5 \pm 46$ s, $ZO=395.5 \pm 46.5$ s ; $W=-46.00$, $p=0.0420$) ce que l'on ne retrouve pas chez les animaux exposés ($ZNO=324.5 \pm 47.7$ s, $ZO=275.5 \pm 47.5$ s ; $W=20.00$, $p=0.6232$) (Figure C18a).

Ces résultats montrent que l'exposition aux particules n'affecte pas l'activité locomotrice des animaux adultes dans ce test. On note une préférence de place pour la ZO chez les animaux contrôles, ce qui est attendu, mais pas chez les animaux exposés, suggérant un possible défaut dans leur capacité à discriminer les deux zones.

1.1.1.2. Exploration et reniflage des boules à thé

En ce qui concerne le nombre total de contacts entre les deux boules à thé, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux (**animaux contrôles** : 4.3 ± 1.3 contacts ; **animaux exposés** : 4.2 ± 0.9 contacts ; $U=87.00$, $p=0.9802$), indiquant une activité d'exploration des boules à thé comparable entre les 2 groupes, mais peu importante. Les analyses statistiques n'ont pas révélé de

différence significative de l'attraction pour une boule en particulier entre les deux groupes d'animaux (**boule vide** : $U=86.00$, $p=0.9380$; **boule pleine** : $U=83.50$, $p=0.8415$) (Figure C18b).

Chez les animaux contrôles, on note une tendance à l'augmentation du nombre de contacts avec la boule pleine par rapport à la boule vide ($W=-17.00$, $p=0.0890$), ce qui n'a pas été observé chez les animaux exposés ($W=-36.00$, $p=0.1664$).

En ce qui concerne le temps de contact total pour l'ensemble des boules (Figure C18c), il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes d'animaux (**animaux contrôles** : 15.7 ± 6.1 s ; **animaux exposés** : 12.1 ± 5.3 s ; $U=78.00$, $p=0.6384$). De même, le temps de contacts avec la boule vide ou pleine n'est pas différent entre les 2 groupes d'animaux (**boule vide** : $U=85.00$, $p=0.8982$; **boule pleine** : $U=79.00$, $p=0.6728$). Cependant, chez les animaux contrôles, le temps de contact avec la boule pleine tend à être plus important que celui avec la boule vide, (boule vide : 2.4 ± 1.6 , boule pleine : 13.4 ± 5.9 ; $W=-26.00$, $p=0.0781$), alors que chez les animaux exposés, ce temps est significativement plus élevé (boule vide : 3.3 ± 1.5 , boule pleine : 8.8 ± 4.4 ; $W=-71.00$, $p=0.0278$) (Figure C18c).

L'ensemble des résultats conclut à un effet relativement modeste de l'exposition aux PFD sur la discrimination olfactive des lapins vis-à-vis d'une odeur alimentaire à PND118. Les animaux contrôles passent plus de temps dans la ZO, associé à une tendance pour un nombre et un temps de contact plus importants avec la boule pleine que la vide, les animaux contrôles faisant donc globalement preuve d'intérêt et de discrimination olfactive pour l'odeur de foin. Les animaux exposés, quant à eux, ne semblent pas discriminer l'odeur de foin, tel que le montre l'absence de préférence de place pour la ZO et un nombre de contacts comparable pour les boules vide et pleine, bien que le temps de reniflage soit plus élevé pour la boule pleine que pour la boule vide.

1.1.2. Analyse des performances olfactives à PND118 suite à un jeûne modéré de 16H

1.1.2.1. Activité locomotrice et préférence de place

Afin d'accroître la valence de l'odeur de foin (et la motivation de l'animal pour ce dernier), les animaux ont été laissés à jeun une nuit et testés dans les mêmes conditions le lendemain matin (temps de jeûne : 16H). Les données obtenues sont présentées dans la Figure C35. Le nombre total de passages entre la ZO et la ZNO est comparable entre les 2 groupes (**contrôles** : 10.1 ± 1.1 passages ; **exposés** : 9.2 ± 1.7 ; $U=71.50$, $p=0.4281$). En ce qui concerne le temps passé dans chaque zone d'intérêt (Figure C19a), le comportement de préférence de place est comparable entre les groupes (**ZNO** : $U=71.00$, $p=0.4155$; **ZO** : $U=71.00$, $p=0.4155$) ; les animaux semblent rester autant de temps dans les deux zones (**contrôle** : **ZNO**= 304.7 ± 30.2 s, **ZO**= 295.3 ± 30.2

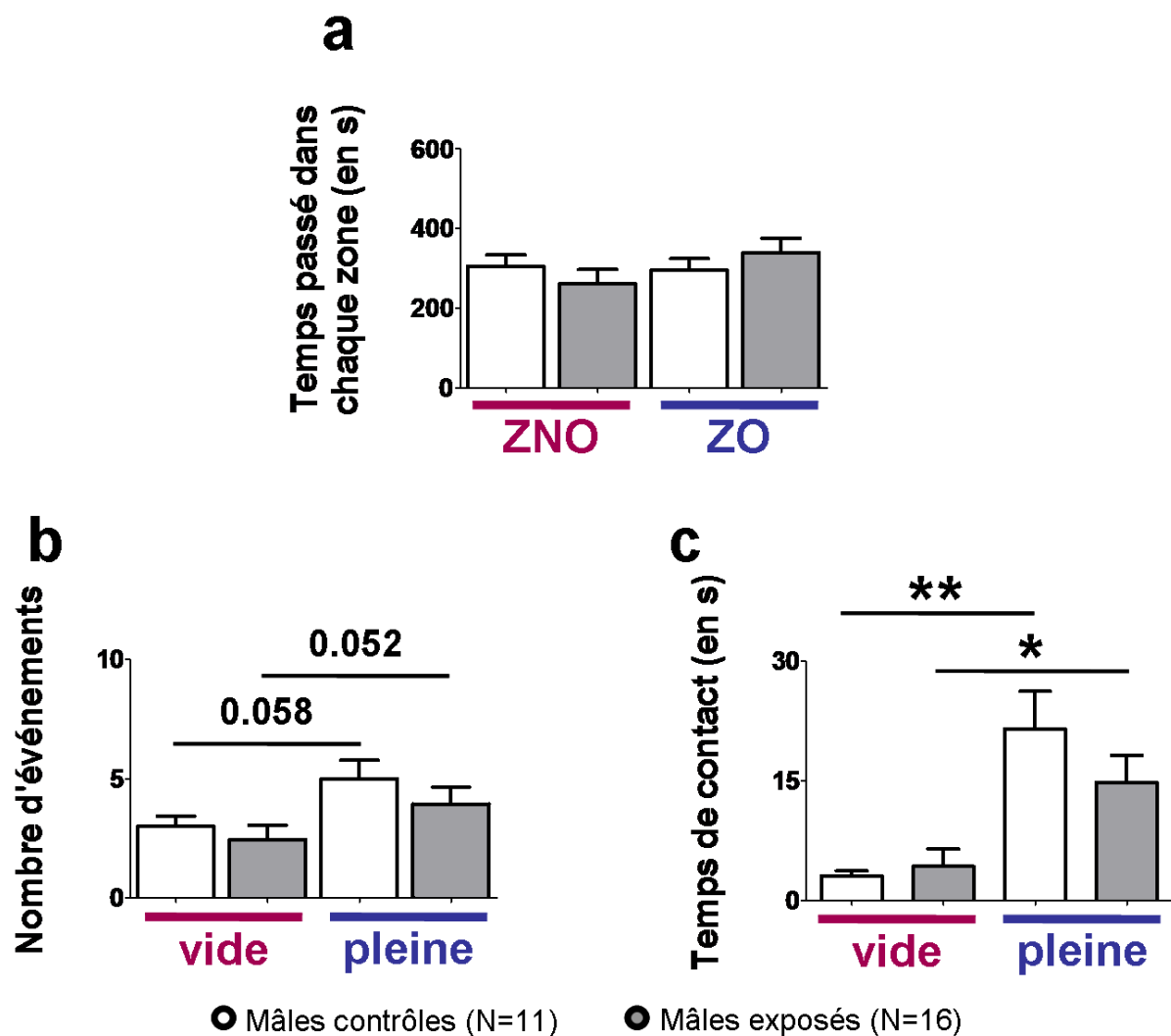


Figure C19 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND118 après 16 heures de jeûne. a. Temps (en secondes) passé dans la zone « non-odorisée » (ZNO) et dans la zone « odorisée » (ZO). b. Nombre de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). c. Temps de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=11 mâles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=16 mâles, en gris) sont exprimés en moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

s ; $W=18.00$, $p=0.4648$; **exposés** : $ZNO=260.9 \pm 36.9$ s, $ZO=339.7 \pm 36.7$ s ; $W=-38.00$, $p=0.3388$).

Ces résultats concluent à une activité locomotrice comparable entre les groupes d'animaux après 16H de jeûne.

1.1.2.2. Exploration et reniflage des boules à thé

Le nombre total de contact du nez des animaux avec les deux boules est comparable entre les 2 groupes d'animaux (**contrôles** : 7.3 ± 1.0 ; **exposés** : 6.4 ± 0.9 ; $U=63.50$, $p=0.2331$), ainsi que le nombre de contacts avec une boule en particulier (**boule vide** : $U=61.00$, $p=0.1834$; **boule pleine** : $U=75.00$, $p=0.5344$) (Figure C19b). En revanche, le nombre de contacts avec la boule pleine est ici plus élevé qu'avec la boule vide pour les deux groupes (**contrôle** : $W=-23.00$, $p=0.0583$; **exposés** : $W=-69.00$, $p=0.0524$). Le temps de contact tant de la boule vide que de la boule pleine est comparable entre les deux groupes d'animaux (**contrôles** : 24.6 ± 5.3 s ; **exposés** : 19.0 ± 4.1 s ; $U=73.50$, $p=0.4896$) (Figure C119c) ainsi que le temps de contact avec une boule en particulier (**boule vide** : $U=63.00$, $p=0.2236$; **boule pleine** : $U=65.00$, $p=0.2664$). Dans les deux groupes d'animaux, le temps de contact avec la boule pleine s'avère être plus élevé qu'avec la boule vide (**contrôle** : **boule vide** : 3.1 ± 0.7 , **boule pleine** : 21.5 ± 5.0 ; $W=-66.00$, $p=0.001$; **exposés** : **boule vide** : 4.3 ± 2.3 , **boule pleine** : 14.8 ± 3.5 ; $W=-83.00$, $p=0.0199$).

L'ensemble des données montre un profil du comportement relatif à la discrimination olfactive de l'odeur de foin comparable entre les deux groupes d'animaux après 16H de jeûne.

1.1.2.3. Effets de la mise à jeun sur les performances olfactives des animaux

Concernant l'effet de la mise à jeun chez les animaux contrôles, les données statistiques n'ont pas révélé de différence sur le nombre total de changements de zone ($W=19.00$, $p=0.3574$). En revanche, on note une tendance à l'augmentation du temps passé dans la ZNO et la ZO, les animaux restant moins inactifs dans la zone médiane (**pour ZNO** : $W=-41.00$, $p=0.0752$; **pour ZO** : $W=41.00$, $p=0.0752$). De plus, on observe une augmentation significative du nombre total de contacts avec les 2 boules ($W=-37.00$, $p=0.0324$), une tendance à l'augmentation du nombre de contacts avec la boule pleine ($W=-34.00$; $p=0.0901$), mais pas avec la boule vide ($W=-28.00$, $p=0.1076$). En outre, les analyses statistiques n'ont pas révélé de différence significative sur le temps total de contact des boules à thé ($W=-34.00$, $p=0.1475$) ; on note une tendance à l'augmentation du temps de contact avec la boule vide ($W=-35.00$, $p=0.0823$), mais pas avec la boule pleine ($W=-30.00$, $p=0.1971$).

Chez les animaux exposés, la mise à jeun augmente significativement le nombre total de changements de zone ($W=58.00$, $p=0.0249$), sans pour autant observer de

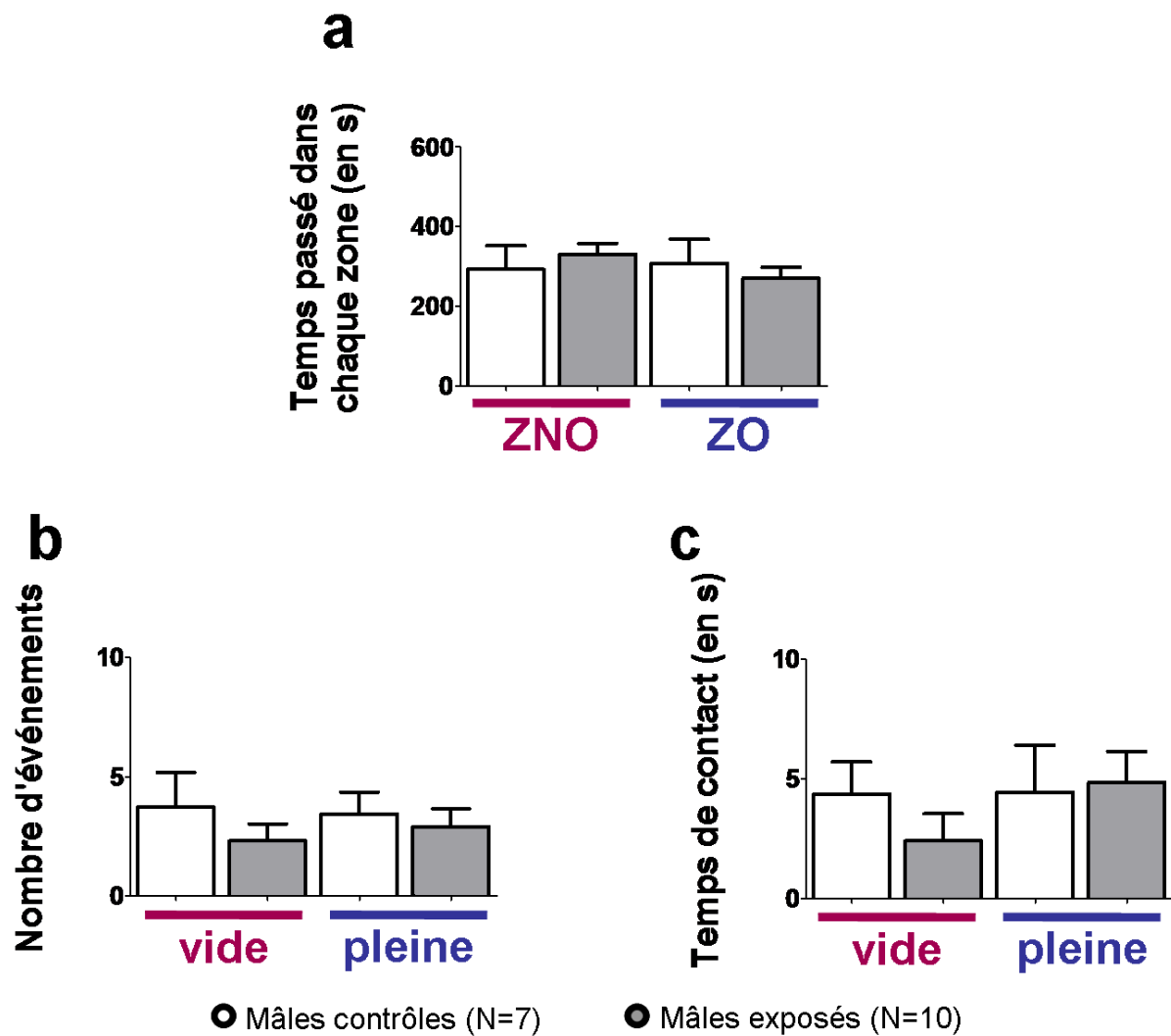


Figure C20 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND190. a. Temps (en secondes) passé dans la zone « non-odorisée » (ZNO) et dans la zone « odorisée » (ZO). **b.** Nombre de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). **c.** Temps de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=7 mâles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=10 mâles, en gris) sont exprimés en moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

différence sur le temps passé dans l'une ou l'autre des zones d'intérêt (**pour ZNO** : $W=42.00$, $p=0.2891$; **pour ZO** : $W=-42.00$, $p=0.2891$). On note une tendance à l'augmentation du nombre de total de contacts ($W=-44.00$, $p=0.0907$), avec une augmentation du nombre de contacts avec la boule pleine ($W=-55.00$; $p=0.0887$), mais pas avec la boule vide, selon l'état nutritionnel ($W=-35.00$, $p=0.2805$). Finalement, les données statistiques n'ont pas révélé de différence liée au jeûne sur le temps total de contact avec les 2 boules ($W=-50.00$, $p=0.1688$), avec la boule vide ($W=-13.00$, $p=0.7055$) ou la boule pleine ($W=-39.00$, $p=0.2329$).

Ces résultats montrent que la mise à jeun influence légèrement la motivation des animaux contrôles, qui passent plus de temps dans les zones ZNO et ZO et présentent un nombre de contacts plus important avec la boule pleine, mais aussi la boule vide. Quant aux animaux exposés, ils augmentent leur activité locomotrice, sans pour autant modifier leur préférence de place ; ils présentent un nombre de contacts plus important avec la boule pleine, mais les temps totaux de contact restent inchangés. Cela ne nous permet pas de conclure que la mise à jeun affecte de manière notable l'intérêt olfactif des animaux pour la boule contenant le foin, ni conclure à une modification des performances olfactives après un jeûne modéré. En effet, l'ensemble des résultats montre que l'exposition aux PFD ne semble pas affecter de manière majeure le processus de discrimination olfactive à PND118 pour une odeur alimentaire à l'état nourri ou après un jeûne modéré, les paramètres enregistrés montrant majoritairement une attraction différentielle pour la boule pleine. Curieusement, les animaux nés de mères exposées ne présentent pas de préférence de place, ni d'augmentation du nombre de contacts avec la boule pleine, malgré un temps de contact augmenté.

1.1.3. Analyse de la discrimination olfactive à PND190 en condition standard d'élevage

1.1.3.1. Activité locomotrice et préférence de place

A PND190, les animaux ont été réévalués dans le test de la boule à thé dans les mêmes conditions expérimentales.

En ce qui concerne le nombre de changements de place, les analyses statistiques n'ont révélé aucun effet significatif sur le nombre de changements totaux entre la ZO et la ZNO (en moyenne, il y a eu 11.3 ± 2.7 passages pour les animaux contrôles et 10.2 ± 1.8 passages pour les animaux exposés ; $U=24.50$, $p=0.3222$).

En ce qui concerne le temps passé dans chaque zone d'intérêt (Figure C20a), aucune différence n'a été observée entre les deux groupes sur le temps passé dans chacune des deux zones, ce qui suggère que l'exposition aux PFD n'altère pas le comportement de préférence de place ; les animaux restent autant de temps dans les deux zones (**contrôles** : **ZNO**= 292.1 ± 64.9 s, **ZO**= 307.9 ± 64.9 s ; $W=-2.00$, $p=0.9375$; **exposés** : **ZNO**= 330.0 ± 29.3 s, **ZO**= 270.0 ± 29.3 s ; $W=24.00$, $p=0.2408$).

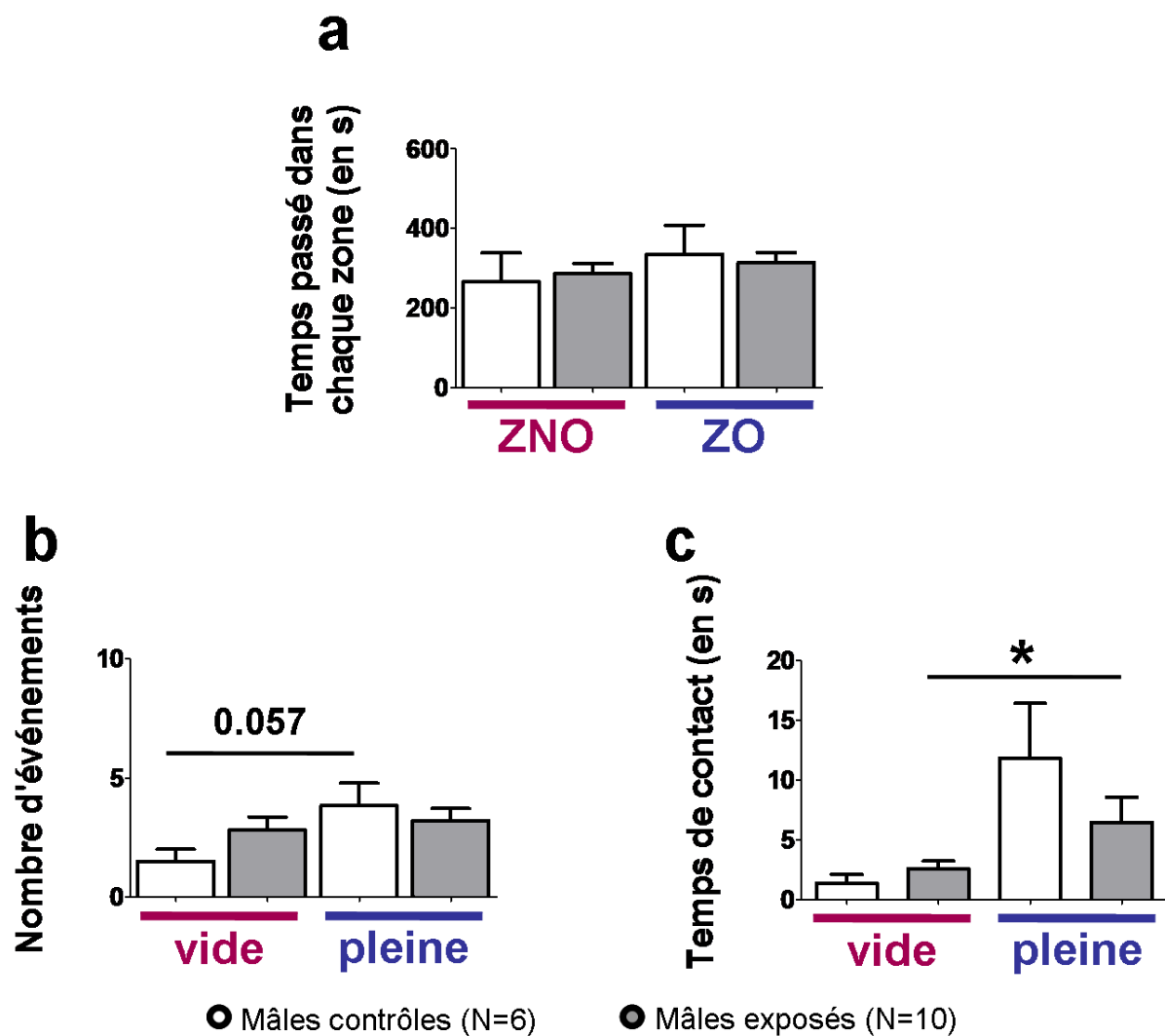


Figure C21 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la discrimination olfactive chez les mâles à PND190 après 16 heures de jeûne. a. Temps (en secondes) passé dans la zone « non-odorisée » (ZNO) et dans la zone « odorisée » (ZO). b. Nombre de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). c. Temps de contacts avec la boule vide (vide) et pleine (pleine). Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=6 mâles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=10 mâles, en gris) sont exprimés en moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

Ces résultats montrent que l'exposition aux particules n'affecte pas l'activité locomotrice et la préférence de place des animaux.

1.1.3.2. Exploration et reniflage des boules à thé

Le nombre total de contacts avec les boules à thé n'est pas significativement différent entre les deux groupes (**contrôles** : 7.1 ± 1.7 contacts ; **exposés** : 5.2 ± 1.2 contacts ; $U=26.00$; $p=0.4033$), de même que le nombre de contacts avec une boule particulière (**boule vide** : $U=26.50$, $p=0.4257$; **boule pleine** : $U=32.00$, $p=0.8042$) (Figure C20b).

Aucune différence significative n'a été observée sur le temps total de contacts avec les boules à thé entre les deux groupes d'animaux (**contrôles** : 8.8 ± 2.6 s ; **exposés** : 7.3 ± 1.8 s ; $U=30.50$, $p=0.6961$), ou le temps de contacts avec une boule en particulier (**boule vide** : $U=22.00$, $p=0.2188$; **boule pleine** : $U=32.50$, $p=0.8440$) (Figure C20c).

L'ensemble des résultats permet de conclure que l'exposition fœtale aux PFD n'influence pas le comportement de motivation des lapins mâles PND190 pour une odeur hédonique.

1.1.4. Analyse de la discrimination olfactive à PND190 suite à un jeûne modéré de 16H

1.1.4.1. Activité locomotrice et préférence de place

Après mise à jeun, le nombre de changements de place entre la ZO et la ZNO n'est pas différent entre les 2 groupes (12.0 ± 3.9 passages pour les contrôles et 9.4 ± 1.1 passages pour les exposés ; $U=24.00$; $p=0.5487$).

En ce qui concerne le temps passé dans chaque zone d'intérêt (Figure C21a), les analyses statistiques montrent que l'exposition aux PFD n'altère pas ce comportement, indicateur d'une préférence de place ; les animaux semblent rester autant de temps dans les deux zones (**contrôles** : **ZNO**= 265.4 ± 80.0 s, **ZO**= 334.6 ± 80.0 s ; $W=-9.00$, $p=0.4375$; **exposés** : **ZNO**= 286.3 ± 26.8 s, **ZO**= 313.7 ± 26.8 s ; $W=-5.00$, $p=0.8457$).

Ainsi, après 16H de jeûne, l'activité locomotrice reste comparable entre les deux groupes d'animaux qui ne présentent pas de préférence de place.

1.1.4.2. Exploration et reniflage des boules à thé

Concernant le nombre de contact avec les boules vide ou pleine, nous n'avons pas observé de différence significative du nombre total de contacts entre les deux groupes d'animaux (**contrôles** : 5.3 ± 1.5 contacts ; **exposés** : 6.0 ± 1.0 contacts ; $U=27.50$; $p=0.8264$), ni du nombre de contacts avec une boule particulière (**boule vide** : $U=17.00$, $p=0.1609$; **boule pleine** : $U=23.50$, $p=0.5056$).

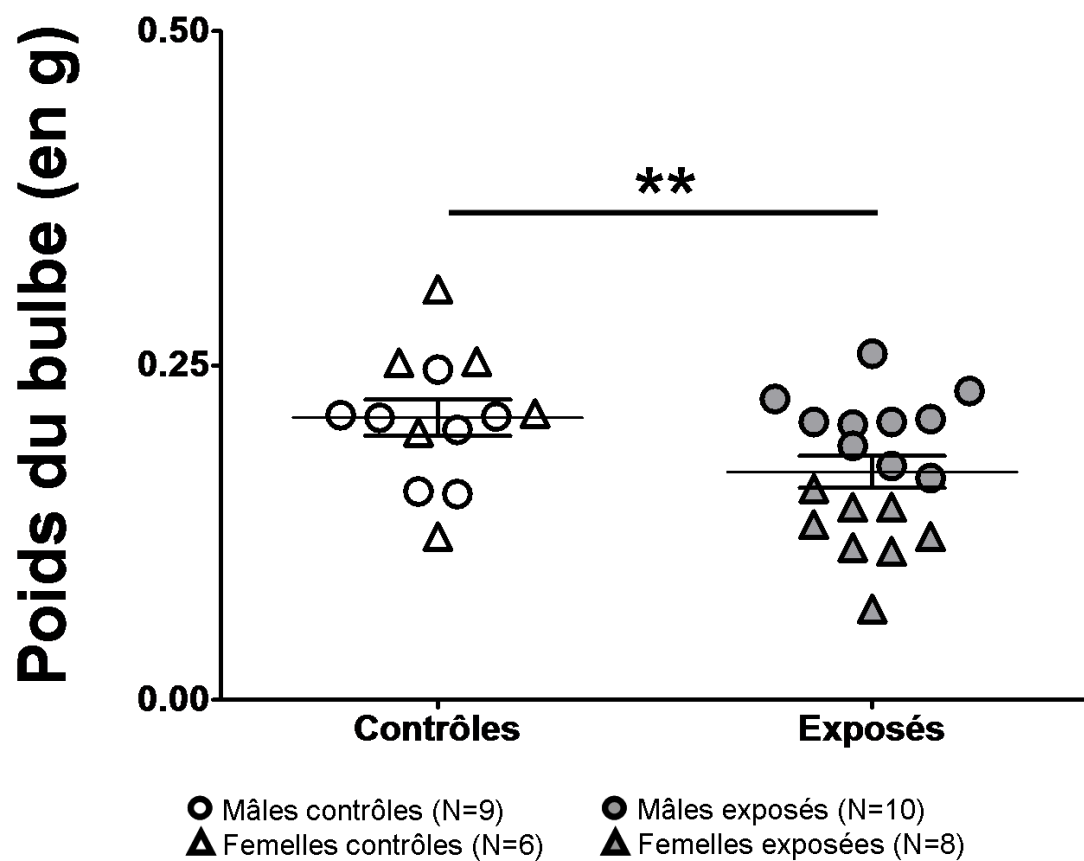


Figure C22 : Poids du bulbe olfactif des animaux adultes de la génération F1 prélevés à PND216. 13 animaux issus de mères contrôles (N=7 mâles et N=6 femelles, en blanc) et 18 animaux issus de mères exposées (N=10 mâles et N=8 femelles, en gris) ont été sacrifiés au 216^e jour de vie postnatale, et les bulbes olfactifs disséqués et pesés. Les résultats sont exprimés en nuage de points avec représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : <0.05 ; ** : <0.01 . Les femelles sont représentées par des triangles, les mâles par des cercles.

Chez les contrôles, le nombre de contacts avec la boule pleine est plus important qu'avec la boule vide ($W=-15.00$, $p=0.0579$), ce qui n'est pas observé chez les animaux exposés; ($W=-9.00$, $p=0.5697$) (Figure C21b).

En ce qui concerne le temps de contact (Figure C21c), il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes d'animaux sur le temps total de contact avec les boules à thé (**contrôles** : 13.2 ± 4.9 s ; **exposés** : 9.0 ± 2.8 s ; $U=19.50$, $p=0.2767$), ni sur le temps de contact avec une boule en particulier (**boule vide** : $U=17.50$, $p=0.1881$; **boule pleine** : $U=20.00$, $p=0.3017$). Nous n'avons pas observé de différence significative entre le temps de contact avec la boule pleine et avec la boule vide chez les animaux contrôles (**boule vide** : 1.3 ± 0.8 , **boule pleine** : 11.8 ± 5.0 ; $W=-13.00$, $p=0.1250$). En revanche, les animaux exposés présentent un temps de contact avec la boule pleine significativement plus important qu'avec la boule vide (**boule vide** : 2.6 ± 0.7 , **boule pleine** : 6.5 ± 2.2 ; $W=-35.00$, $p=0.0438$).

1.1.4.3. Effets de la mise à jeun sur les performances olfactives des animaux

Chez les animaux contrôles, les données statistiques n'ont pas révélé d'effet de la mise à jeun sur le nombre de changements totaux ($W=6.00$, $p=0.5992$, ni sur le temps total passé dans chaque zone d'intérêt (**pour ZNO** : $W=11.00$, $p=0.3125$; **pour ZO** : $W=-11.00$, $p=0.3125$). De plus, on n'observe pas de différence pour le nombre de contacts totaux ($W=8.00$, $p=0.4606$), et le nombre de contacts avec la boule pleine ($W=-5.00$, $p=0.6707$) ; en revanche, on note une tendance à la diminution du nombre de contacts avec la boule vide ($W=10.00$; $p=0.0975$). Le temps total de contact sur une boule en particulier n'est pas affecté par la mise à jeun (**Pour le temps total** : $W=-5.00$, $p=0.6875$; **pour la boule vide** : $W=15.00$, $p=0.1563$; **pour la boule pleine** : $W=-13.00$, $p=0.1250$).

Concernant l'effet de la mise à jeun chez les animaux exposés, les données statistiques n'ont pas révélé de différences sur le nombre total de changement de zone ($W=21.00$, $p=0.3040$) ni sur le temps total passé dans les zones d'intérêt (**pour ZNO** : $W=29.00$, $p=0.1602$; **pour ZO** : $W=-29.00$, $p=0.1602$). De plus, on n'observe pas de différence sur le nombre de contacts totaux, ni sur le nombre de contacts avec une boule en particulier (**pour le nombre total** : $W=-11.00$, $p=0.3955$; **pour la boule pleine** : $W=-5.00$, $p=0.8107$; **pour la boule vide** : $W=-13.00$, $p=0.5368$), ni même sur le temps total de contact sur une boule en particulier (**Pour le temps total** : $W=2.00$, $p=0.9593$; **pour la boule vide** : $W=-2.00$, $p=0.9592$; **pour la boule pleine** : $W=-9.00$, $p=0.6831$).

Ces résultats semblent montrer que la mise à jeun n'a pas été efficace sur l'augmentation attendue de l'intérêt des animaux pour le test ou la boule à thé.

L'ensemble des résultats montre que l'exposition gestationnelle aux PFD n'affecte pas le processus de discrimination olfactive chez les animaux à PND190. Curieusement, les animaux issus de mères exposées à PND118 à l'état nourri présentent un profil

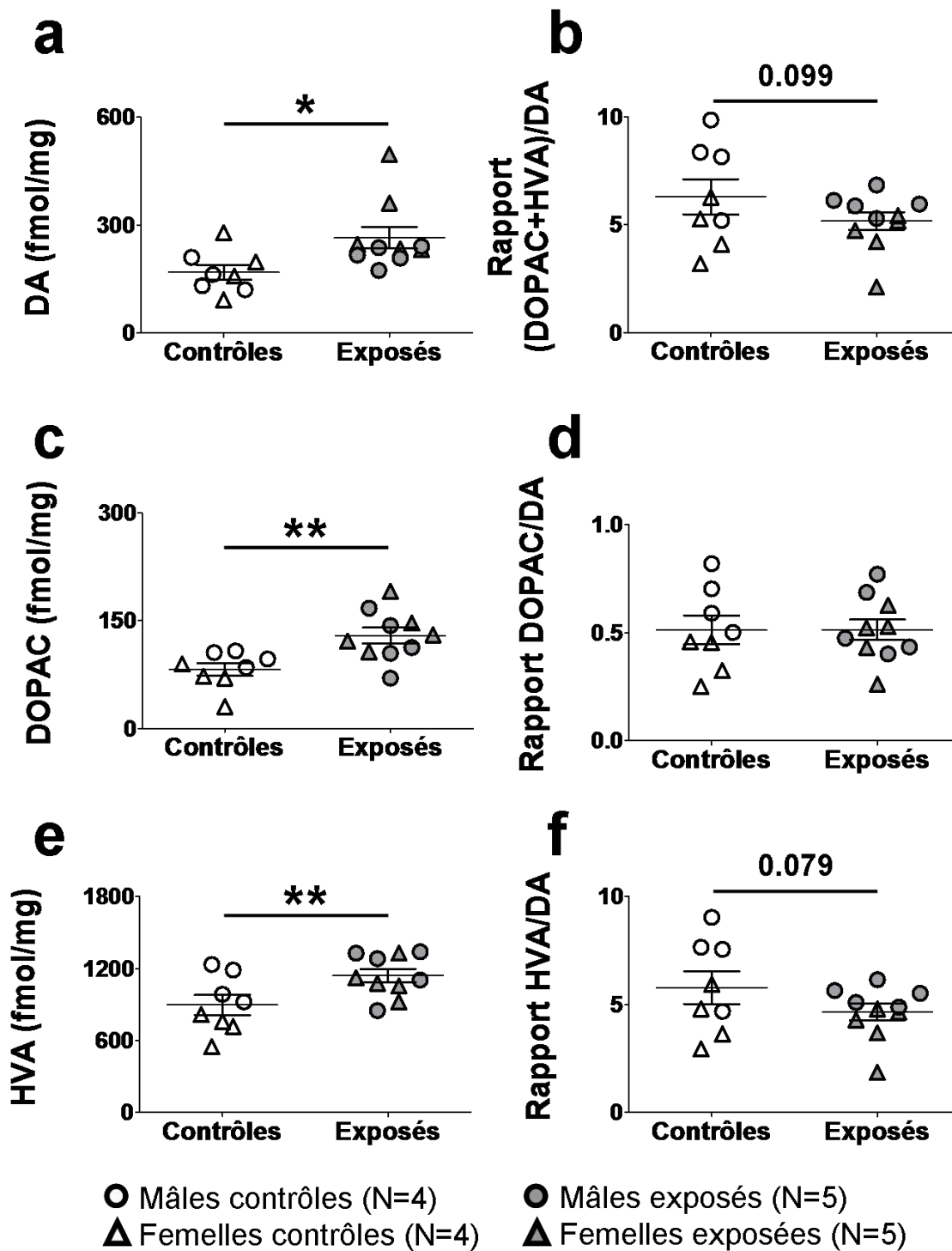


Figure C23 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie dopaminergique bulbaire des adultes F1. Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **DA** : Dopamine ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HVA** : Acide homovanillique.

comparable de celui observé à PND190 à jeun. En effet, ces derniers ne présentent pas de préférence de place, ni d'augmentation du nombre de contacts avec la boule pleine, malgré un temps de contact augmenté.

1.2. Analyse du poids des bulbes olfactifs

A PND216 (6,5 mois), les BO des animaux mâles et femelles ont été prélevés. L'analyse statistique a mis en évidence une diminution du poids des BO des animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,30)} = 11.199$, $p = 0.002$), avec un effet du sexe ($F_{(1,30)} = 4.500$, $p = 0.043$) ainsi qu'une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,30)} = 15.720$, $p < 0.001$). On note une diminution de 45% du poids des BO chez les femelles exposées et une stabilité (+4%) du poids des BO chez les mâles exposés par rapport aux contrôles (Figure C22).

Ainsi, l'exposition gestationnelle répétée aux PFD mène à des altérations sexe-dépendantes du poids bulbaire chez les animaux au stade PND216.

1.3. Analyse de la neuromodulation monoaminergique au niveau olfactif

Afin d'avoir des éléments de réponse quant à une éventuelle persistance des altérations des voies monoaminergiques observées au stade foetal, la neuromodulation des circuits neuronaux associés aux réponses olfactives des animaux adultes a été étudiée *via* des approches neurochimiques et immunohistochimiques.

1.3.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique

1.3.1.1. Approche neurochimique

L'analyse statistique a mis en évidence une augmentation de 56 % du niveau dopaminergique bulbaire chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,17)} = 7.197$, $p = 0.018$) ; cette altération n'est pas liée au sexe ($F_{(1,17)} = 2.996$, $p = 0.105$) et ne met pas en évidence d'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,17)} = 1.057$, $p = 0.321$) (Figure C23a).

Le niveau de DOPAC bulbaire (Figure C23c) est également significativement augmenté (+57%) chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,17)} = 11.594$, $p = 0.004$) ; cette altération n'est pas liée au sexe ($F_{(1,17)} = 0.241$, $p = 0.631$), alors qu'une tendance à l'interaction entre le type d'exposition et le sexe a été observée ($F_{(1,17)} = 3.619$, $p = 0.078$), avec une augmentation de 112 % du niveau de DOPAC chez les femelles exposées et une augmentation de 21% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Concernant l'HVA bulbaire (Figure C23e), l'analyse statistique a mis en évidence une augmentation de 27% du niveau de ce métabolite chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,17)} = 10.052$, $p = 0.007$) ; des différences liées au sexe ont également été observées ($F_{(1,17)} = 8.636$, $p = 0.011$), les femelles présentant des

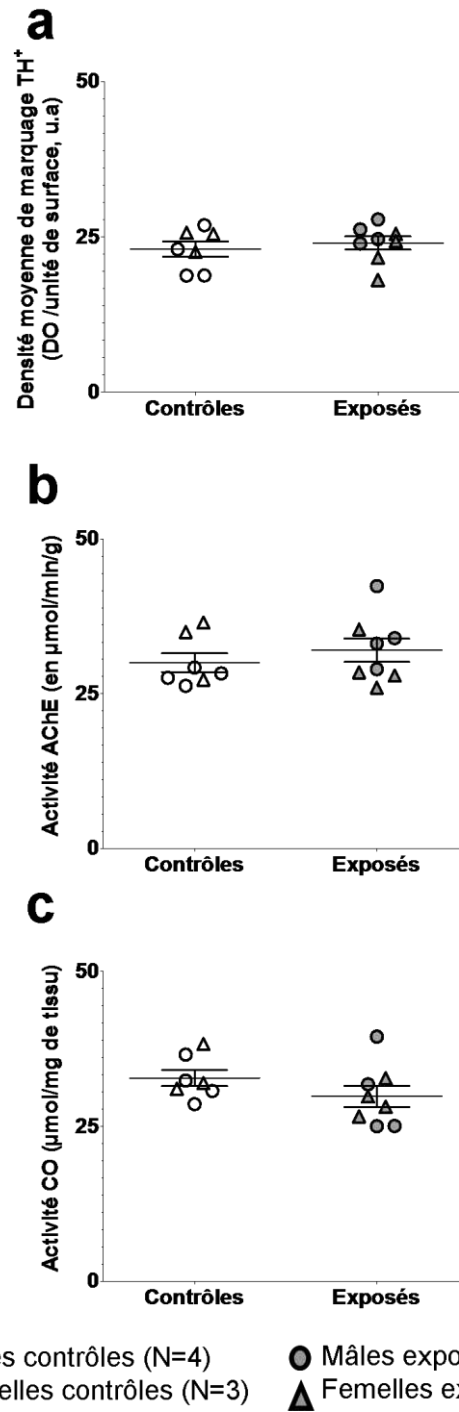


Figure C24 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les arrivées axonales dopaminergiques et cholinergiques au niveau du BO des adultes F1. a. Représentation graphique de la densité moyenne de marquage TH⁺ au niveau du tubercule olfactif (Tu). b. Représentation graphique de l'activité AChE au niveau du Tu. c. Représentation graphique de l'activité CO au niveau du Tu. Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **TH** : Tyrosine hydroxylase ; **AChE** : Acétylcholinestérase ; **CO** : Cytochrome oxydase.

niveaux plus bas que les mâles. Une tendance à l'interaction entre le type d'exposition et le sexe a également été observée ($F_{(1,17)} = 3.576$, $p = 0.080$), avec une augmentation de 55% du niveau d'HVA chez les femelles exposées par rapport aux femelles contrôles et une augmentation de 9% du niveau d'HVA chez les mâles exposés par rapport aux mâles contrôles.

Concernant les rapports DOPAC/DA (Figure C23d), l'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence entre les animaux liée à l'exposition ($F_{(1,17)} = 0.000$, $p = 0.987$) ; en revanche, ce rapport présente des différences liées au sexe ($F_{(1,17)} = 7.440$, $p = 0.016$), les femelles présentant des valeurs de rapport plus basses que les valeurs calculées chez les mâles. Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 2.346$, $p = 0.148$) (Figure C23d).

Le rapport HVA/DA (Figure C23f) des animaux exposés est diminué de 19% par rapport à celui des animaux contrôles, bien que non significatif ($F_{(1,17)} = 3.583$, $p = 0.079$) ; ce rapport présente des différences liées au sexe ($F_{(1,17)} = 14.450$, $p = 0.002$), les valeurs calculées chez les femelles étant plus faibles que les valeurs des mâles. Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 1.194$, $p = 0.293$).

Enfin, le rapport (DOPAC+HVA)/DA (Figure C23b) des animaux exposés s'avère inférieur de 18% par rapport à celui des animaux contrôles, bien que non significatif ($F_{(1,17)} = 3.131$, $p = 0.099$) ; une différence liée au sexe a été observée ($F_{(1,17)} = 14.755$, $p = 0.002$), les femelles présentant des valeurs plus basses que les mâles. Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été constatée ($F_{(1,17)} = 1.397$, $p = 0.257$).

1.3.1.2. Approche immunohistochimique

Comme évoqué dans la section méthodologique, les tissus olfactifs des adultes F1 n'ont pas été fixés au PFA lors du prélèvement. De ce fait, l'étude histologique n'a pas pu être réalisée. En revanche, une étude immunohistochimique visant la tyrosine hydroxylase (TH, enzyme limitante de la production des catécholamines) a été mise en place au niveau du tubercule olfactif (Tu), voie d'entrée des afférences neuromodulatrices dans le BO (Figure C24).

L'analyse TH⁺ (Figure C24a) n'a révélé aucun effet significatif lié au type d'exposition ($F_{(1,14)} = 0.279$, $p = 0.608$) ou au sexe ($F_{(1,14)} = 0.036$, $p = 0.853$), alors qu'une tendance à l'interaction entre le sexe et l'exposition a été observée ($F_{(1,14)} = 3.870$, $p = 0.075$), reflétée par une diminution du niveau de marquage TH⁺ de 9% chez les femelles exposées et une augmentation de 17% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Le marquage TH⁺ a été complété par une étude histochimique des activités AChE et CO, qui n'a révélé aucune différence significative entre les deux groupes d'animaux (Figure

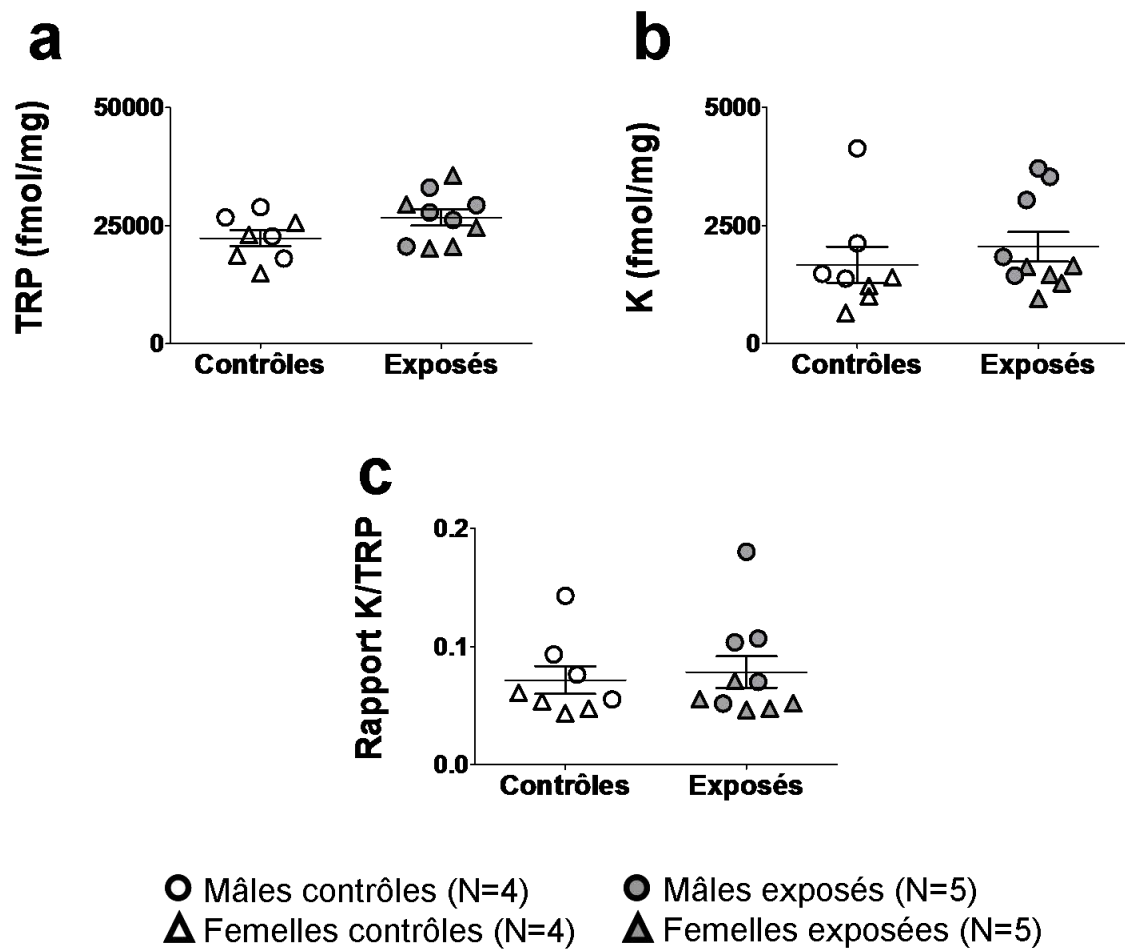


Figure C25 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie kynurénine bulbaire chez des adultes F1. Les résultats obtenus chez les animaux adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **TRP** : Tryptophane ; **K** : Kynurénine.

C24). Seule une interaction entre le sexe et le type d'exposition a été observée concernant l'AChE ($F_{(1,14)} = 5.359$, $p = 0.041$), qui se traduit par une diminution de 10 % de cette activité chez les femelles exposées par rapport aux contrôles et une augmentation de 24% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles.

1.3.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique

1.3.2.1. Approche neurochimique

En ce qui concerne le niveau de tryptophane (TRP), aucune différence significative liée à l'exposition ($F_{(1,17)} = 3.078$, $p = 0.101$) ou au sexe ($F_{(1,17)} = 0.950$, $p = 0.346$) n'a été observée entre les deux groupes d'animaux. Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.196$, $p = 0.664$) (Figure C25a).

Concernant le niveau de Kynurénine (K), l'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différences liées à l'exposition aux PFD ($F_{(1,17)} = 0.927$, $p = 0.352$, Figure C41b), mais des différences liées au sexe ($F_{(1,17)} = 10.240$, $p = 0.006$), avec les femelles présentant des taux plus bas que les mâles. Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.018$, $p = 0.895$) (Figure C25b).

Concernant le rapport K/TRP, l'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence liée à l'exposition ($F_{(1,17)} = 0.199$, $p = 0.662$), tandis qu'une différence liée au sexe a été observée ($F_{(1,17)} = 8.484$, $p = 0.011$), avec un rapport plus bas chez les femelles que chez les mâles (Figure C41c). Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.060$, $p = 0.810$).

L'analyse statistique du niveau de 5-HT (Figure C26), n'a pas mis en évidence de différence liée à l'exposition ($F_{(1,17)} = 1.852$, $p = 0.195$) ou au sexe ($F_{(1,17)} = 1.668$, $p = 0.217$). En revanche, une tendance à une interaction entre le type d'exposition et le sexe a été observée ($F_{(1,17)} = 3.621$, $p = 0.078$), reflétée par une diminution de 25 % du niveau de 5-HT chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe, alors que ce taux reste comparable entre les femelles des deux groupes (Figure C26a).

Le rapport 5-HT/TRP des animaux issus de mères exposées est diminué de 25 % par rapport aux animaux issus de femelles contrôles ($F_{(1,17)} = 5.394$, $p = 0.036$). Aucune différence liée au sexe ($F_{(1,17)} = 3.001$, $p = 0.105$) ou mettant en évidence une interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.315$, $p = 0.583$) (Figure C26b).

Concernant les niveaux de 5-HIAA (Figure C26c), aucune différence liée à l'exposition ($F_{(1,17)} = 1.864$, $p = 0.194$), au sexe ($F_{(1,17)} = 3.094$, $p = 0.100$) ou au niveau de l'interaction des deux ($F_{(1,17)} = 0.111$, $p = 0.744$) n'a été observée entre les deux groupes d'animaux.

L'analyse statistique du rapport 5-HIAA/5-HT a mis en évidence une augmentation de 43% de ce rapport chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,17)} = 5.175$, $p = 0.039$) ; il a également été observé un effet lié au sexe ($F_{(1,17)} = 6.202$, $p = 0.026$), avec les femelles présentant des taux plus bas que les mâles.

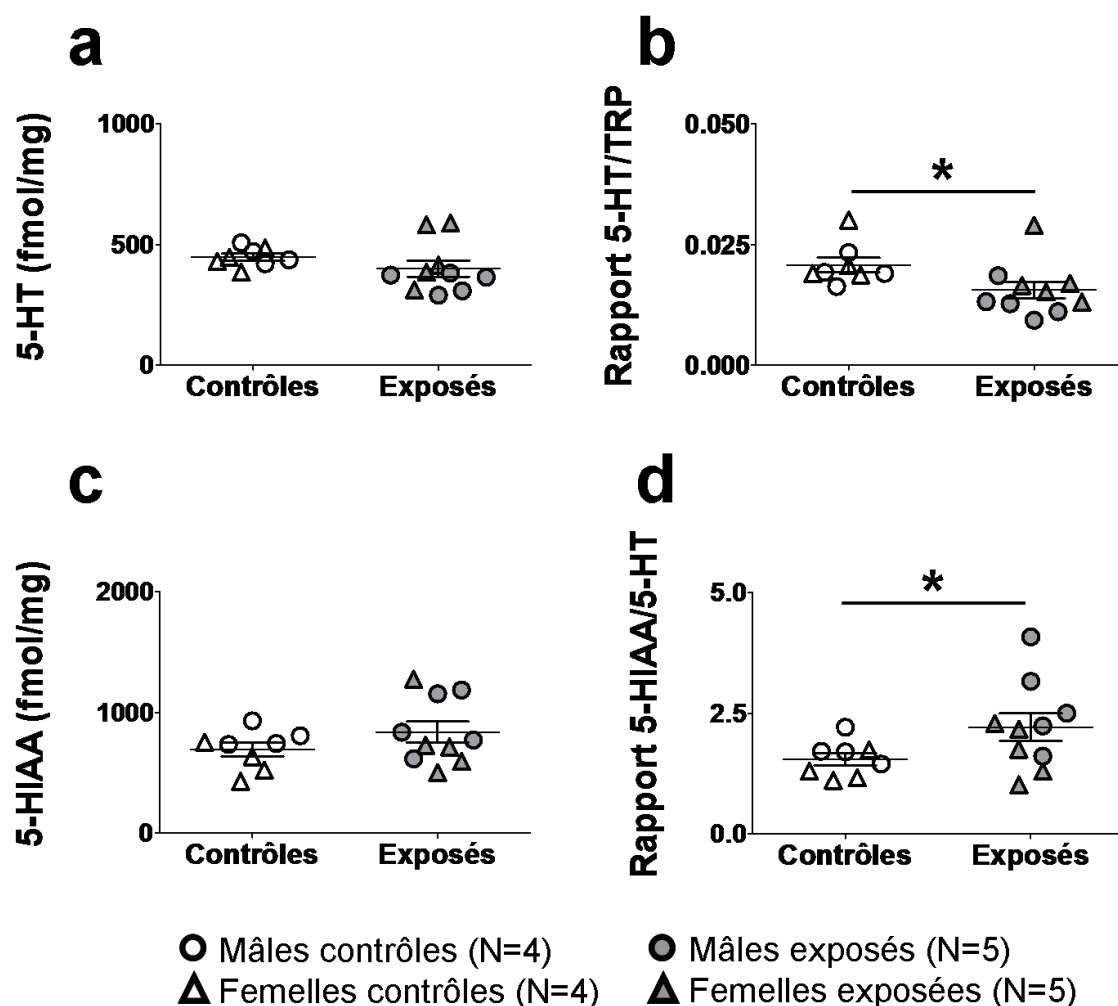


Figure C26 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie sérotoninergique bulbaire des adultes F1. Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **5-HT** : Sérotonine ; **5-HIAA** : 5-hydroxyindolacétique ; **TRP** : Tryptophane.

Aucune interaction entre le type d'exposition et le sexe n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.974$, $p = 0.340$) (Figure C26d).

1.3.2.2. Approche immunohistochimique

Une étude immunohistochimique visant la tryptophane hydroxylase (TrpH, enzyme limitante de la production de sérotonine) a été réalisée dans les mêmes régions olfactives que pour la dopamine. Malheureusement, les valeurs de marquage se sont avérées faibles et non-spécifiques, et n'ont pas permis de réaliser une quantification fiable des résultats de l'immunomarquage.

1.3.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique

En ce qui concerne ce système, seule une approche neurochimique a pu être réalisée. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux concernant les niveaux de noradrénaline (NA), de son métabolite principal MHPG ou du rapport MHPG/NA (Figure C27).

L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans l'encadré 12.

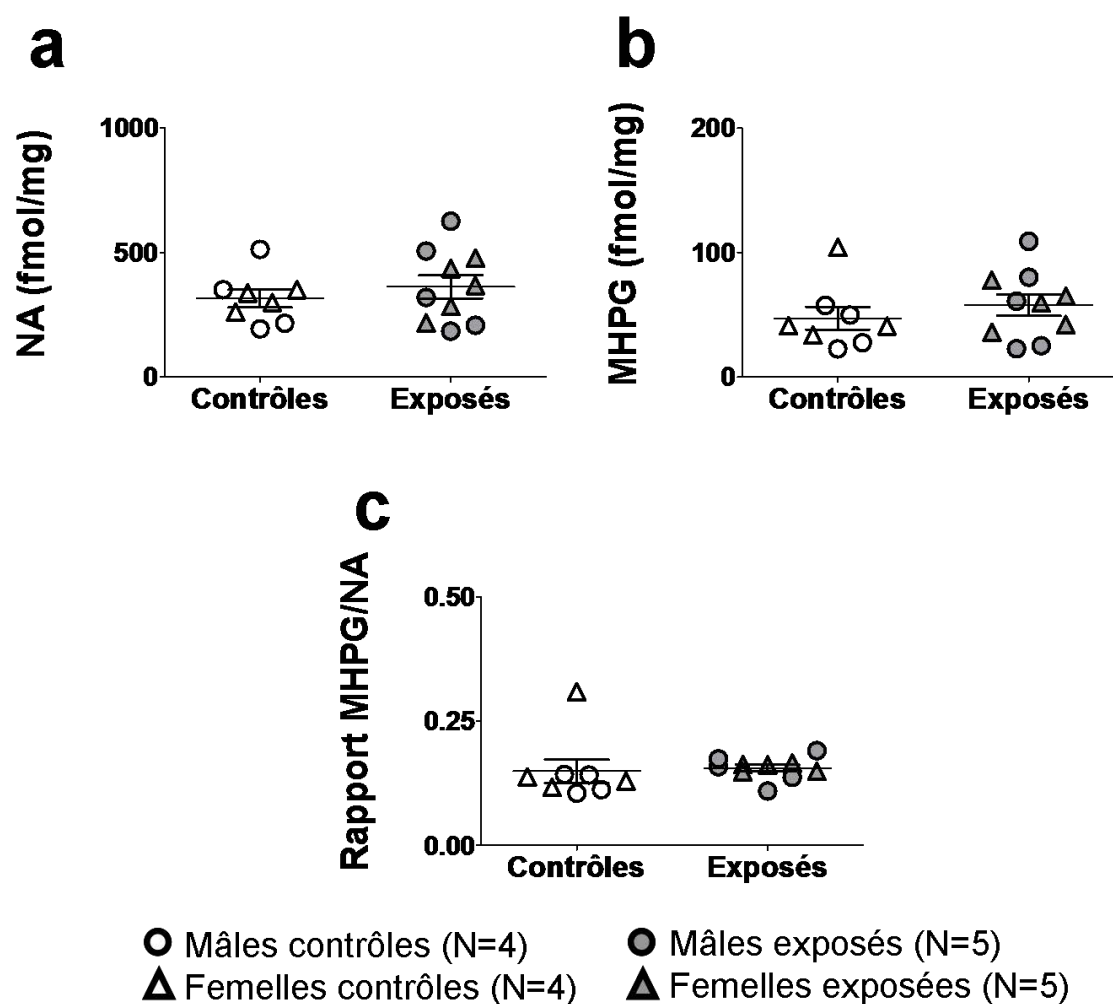


Figure C27 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie noradrénergique bulbaire des adultes F1. Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **NA** : Noradrénaline ; **MHPG** : 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol.

Encadré 12 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur le système olfactif des animaux de la génération F1 au stade adulte

Les résultats obtenus dans le test de discrimination olfactive laissent à penser que les animaux mâles exposés *discriminent correctement* la boule remplie de foin de celle qui est vide. Cependant, le temps de reniflage plus long du foin pourrait indiquer une *difficulté* des animaux à l'identifier correctement, les amenant à renifler de manière plus appuyée et plus longue la boule pour intégrer les différentes dimensions du signal odorant généré par le foin.

Dans ce cas, ce résultat pourrait être **indicateur** d'un problème de performance olfactive persistant à l'âge adulte chez les lapins précocement exposés aux PFD. Cependant, les faibles scores réalisés par les animaux et les différences individuelles fortes, y compris après un jeûne sensé les motiver, rend difficile l'interprétation du test.

Ces résultats comportementaux sont également à mettre en relation avec l'existence d'une dérégulation significative de la **voie dopaminergique** bulbaire, les systèmes **sérotoninergiques** et **noradrénergique** ne présentant pas de différences majeures entre les deux groupes d'animaux.

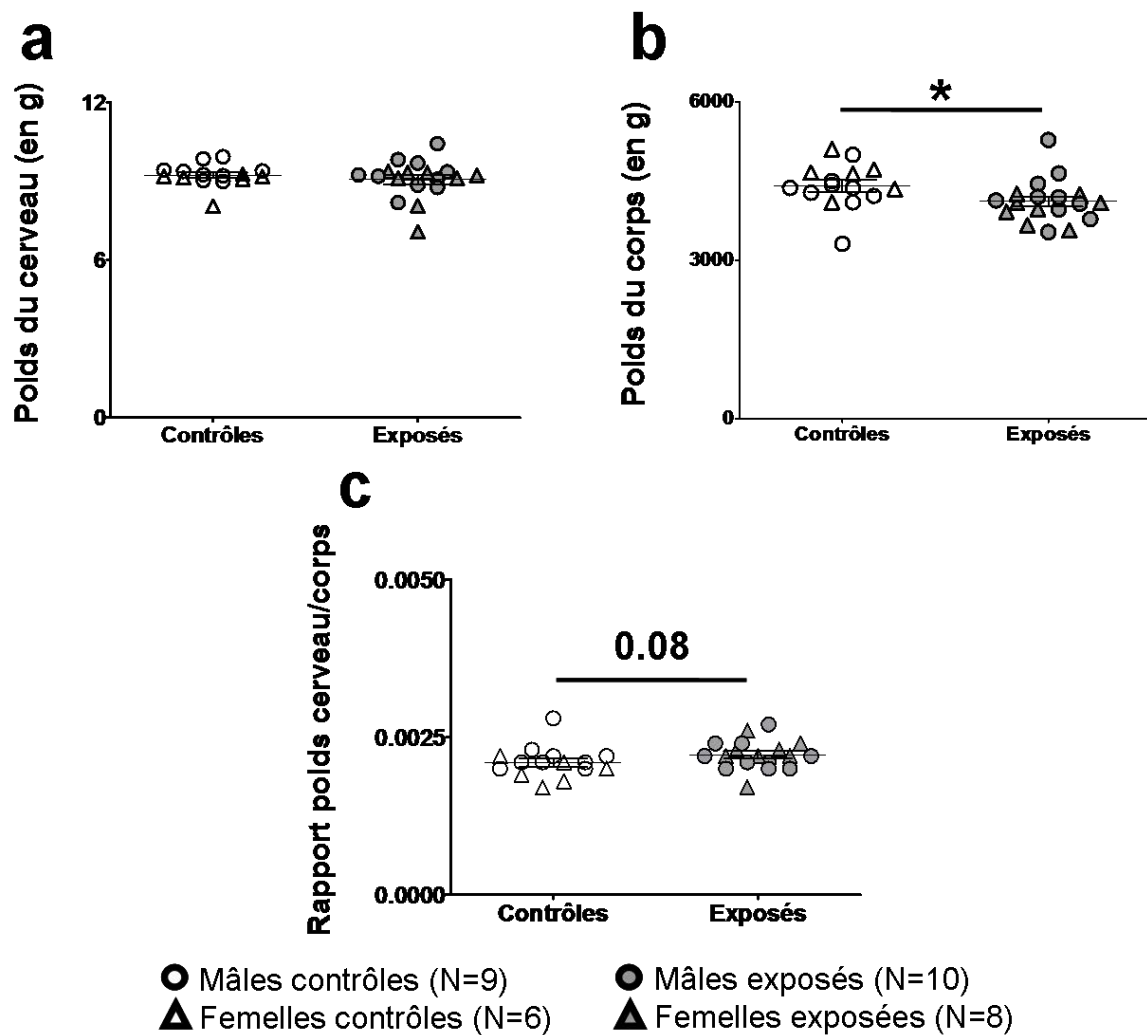


Figure C28 : Mesures morphométriques du cerveau et du corps des adultes F1 prélevés à PND216. 15 animaux issus de mères contrôles (N=9 mâles et N=6 femelles, en blanc et 18 animaux issus de mères exposées (N=10 mâles et N=8 femelles, en gris) ont été sacrifiés au 216^e jour de de vie postnatale, les cerveaux ont été disséqués et pesés (a) après avoir pesé le corps entier (b). Du fait de l'effet de la pollution sur le poids corporel total, le rapport poids du cerveau/poids total a été calculé (c). Les résultats sont exprimés en nuage de points avec représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : <0.05. Les femelles sont représentées par des triangles ; les mâles sont représentés par de cercles.

2. Étude sur le système nerveux central des adultes

2.1. Analyse du poids corporel et du poids des cerveaux des adultes F1

L'analyse statistique du poids des cerveaux prélevés à PN216 n'a pas montré de différence significative liée à l'exposition aux PFD ($F_{(1,32)} = 0.437$, $p = 0.514$) ni d'interaction entre l'exposition et le sexe ($F_{(1,32)} = 0.006$, $p = 0.940$), alors que le poids du cerveau est significativement plus faible chez les femelles que chez les mâles ($F_{(1,32)} = 3.980$, $p = 0.043$) (Figure C28a).

En ce qui concerne le poids corporel, une diminution significative de 7% chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,32)} = 5.700$, $p = 0.024$) a été observée (Figure C28b) ; cette baisse n'est pas liée au sexe ($F_{(1,32)} = 0.043$, $p = 0.837$) mais tend à être liée à l'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,32)} = 3.852$, $p = 0.059$), avec une diminution de 13 % du poids corporel chez les femelles exposées par rapport aux femelles contrôles, alors qu'il reste comparable entre les deux groupes chez les mâles.

Enfin, lorsqu'on rapporte le poids du cerveau au poids du corps, on note une tendance à l'augmentation chez les animaux exposés par rapport aux contrôles, ($F_{(1,32)} = 3.225$, $p = 0.083$) (Figure C28c). Cette altération n'est pas liée au sexe ($F_{(1,32)} = 1.804$, $p = 0.190$) et ne résulte pas de l'interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,32)} = 2.806$, $p = 0.105$).

L'ensemble de ces résultats indique que l'exposition gestationnelle répétée aux PFD mène à des altérations du poids corporel des animaux sans affecter le poids des cerveaux chez les animaux de la génération F1 au stade PND216.

2.2. Analyse de la neuromodulation au niveau central

L'évaluation des niveaux de diverses monoamines a été effectuée au niveau de plusieurs structures cérébrales des animaux PND216 issus de femelles contrôles et exposées, *via* une analyse HPLC.

2.2.1. Étude de la neuromodulation dopaminergique

2.2.1.1. Approche neurochimique

En ce qui concerne les niveaux de dopamine (Figure C29), les résultats ont montré une augmentation significative ou tendant à l'être chez les animaux exposés par rapport aux adultes contrôles dans le cortex préfrontal (CPF) (+32% ; $F_{(1,17)} = 6.832$, $p = 0.020$) et dans le cortex temporal (CxT) (+92% ; $F_{(1,17)} = 3.285$, $p = 0.091$) qui n'est pas lié à l'interaction avec le sexe dans ces deux régions (**CPF** : $F_{(1,17)} = 2.627$, $p = 0.127$; **CxT** : $F_{(1,17)} = 0.405$, $p = 0.535$). Il faut noter un effet significatif du sexe au niveau du CPF, avec des niveaux de concentration plus bas chez les femelles par rapport aux mâles (**CPF** : $F_{(1,17)} = 5.670$, $p = 0.032$; **CxT** : $F_{(1,17)} = 0.894$, $p = 0.360$).

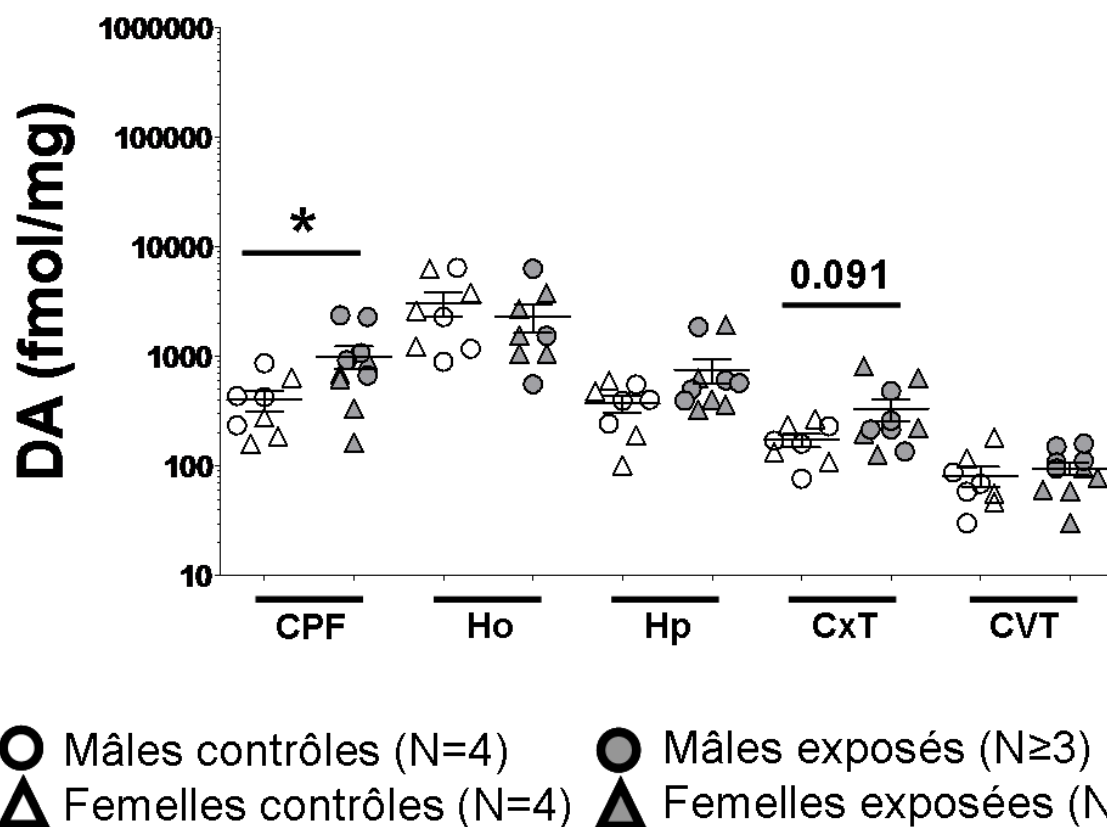


Figure C29 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le niveau de DA central chez les adultes F1. Représentation graphique du niveau de DA au niveau de diverses structures cérébrales chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N≥3 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **DA** : Dopamine ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **CVT** : Cervelet.

Aucune variation significative de la concentration tissulaire de DA, que ce soit sous l'effet de l'exposition aux PFD ou du sexe, n'a été observée dans les autres régions étudiées : l'hypothalamus (Ho), l'hippocampe (Hp) et le cervelet (CVT) (Figure C45). Seule une interaction significative entre les deux facteurs a été observée dans le CVT ($F_{(1,17)} = 8.131$, $p = 0.0013$), qui s'est traduit par une diminution du niveau de DA de 36% chez les femelles exposées et une augmentation de 104% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Concernant les niveaux des deux métabolites de la dopamine mesurés (DOPAC et HVA), aucune différence significative n'a été observée dans les cinq régions étudiées entre les deux groupes d'animaux.

Il est à noter que les niveaux de DOPAC ont tendance à être plus élevés chez les mâles que chez les femelles dans le CPF ($F_{(1,17)} = 3.571$, $p = 0.080$) et l'Hp ($F_{(1,17)} = 3.217$, $p = 0.094$), et plus faibles dans l'Ho ($F_{(1,15)} = 4.448$, $p = 0.057$).

Aucune interaction significative entre l'exposition et le sexe n'a été observée dans ces différentes régions (Figure C30).

Concernant le rapport DOPAC/DA, les résultats ont mis en évidence des diminutions significatives ou tendant à l'être chez les animaux exposés par rapport aux contrôles dans le CPF (46% ; $F_{(1,17)} = 4.281$, $p = 0.058$) et l'Hp (61% ; $F_{(1,17)} = 8.667$, $p = 0.011$) (Figure C31a) ; alors qu'aucune différence liée au sexe et aucune interaction entre les deux facteurs n'ont été observées. Aucune différence significative de ce rapport n'a été mesurée dans les trois autres régions étudiées quelle que soit la source de variation (exposition aux PFD, sexe, interaction).

L'analyse statistique du rapport HVA/DA (Figure C31b) a montré des diminutions significatives chez les animaux exposés par rapport aux contrôles dans le CPF (-47% ; $F_{(1,17)} = 7.362$, $p = 0.017$), le CxT (-41% ; $F_{(1,17)} = 5.356$, $p = 0.036$) et l'Hp (-46% ; $F_{(1,17)} = 17.507$, $p = 0.001$). Des valeurs plus élevées ou tendant à l'être de ce rapport ont été observées chez les femelles par rapport aux mâles dans 2 de ces 3 régions centrales : le CPF ($F_{(1,17)} = 3.185$, $p = 0.096$) et l'Hp ($F_{(1,17)} = 5.001$, $p = 0.042$), sans qu'une interaction significative n'ait été observée.

Dans le Ho et le CVT, aucune différence significative entre les deux groupes d'animaux n'a été mise en évidence (Figure C31b).

Des diminutions significatives du même ordre du rapport (HVA+DOPAC)/DA ont été observées dans les trois mêmes régions (**CPF** : -47%, $F_{(1,17)} = 9.515$, $p = 0.008$; **CxT** : -37%, $F_{(1,17)} = 5.520$, $p = 0.034$; **Hp** : -59%, $F_{(1,17)} = 13.014$, $p = 0.003$) chez les animaux exposés aux PFD par rapport aux contrôles (Figure C31c), sans qu'aucun effet significatif lié au sexe ou à l'interaction entre l'exposition et le sexe ne soit mesuré.

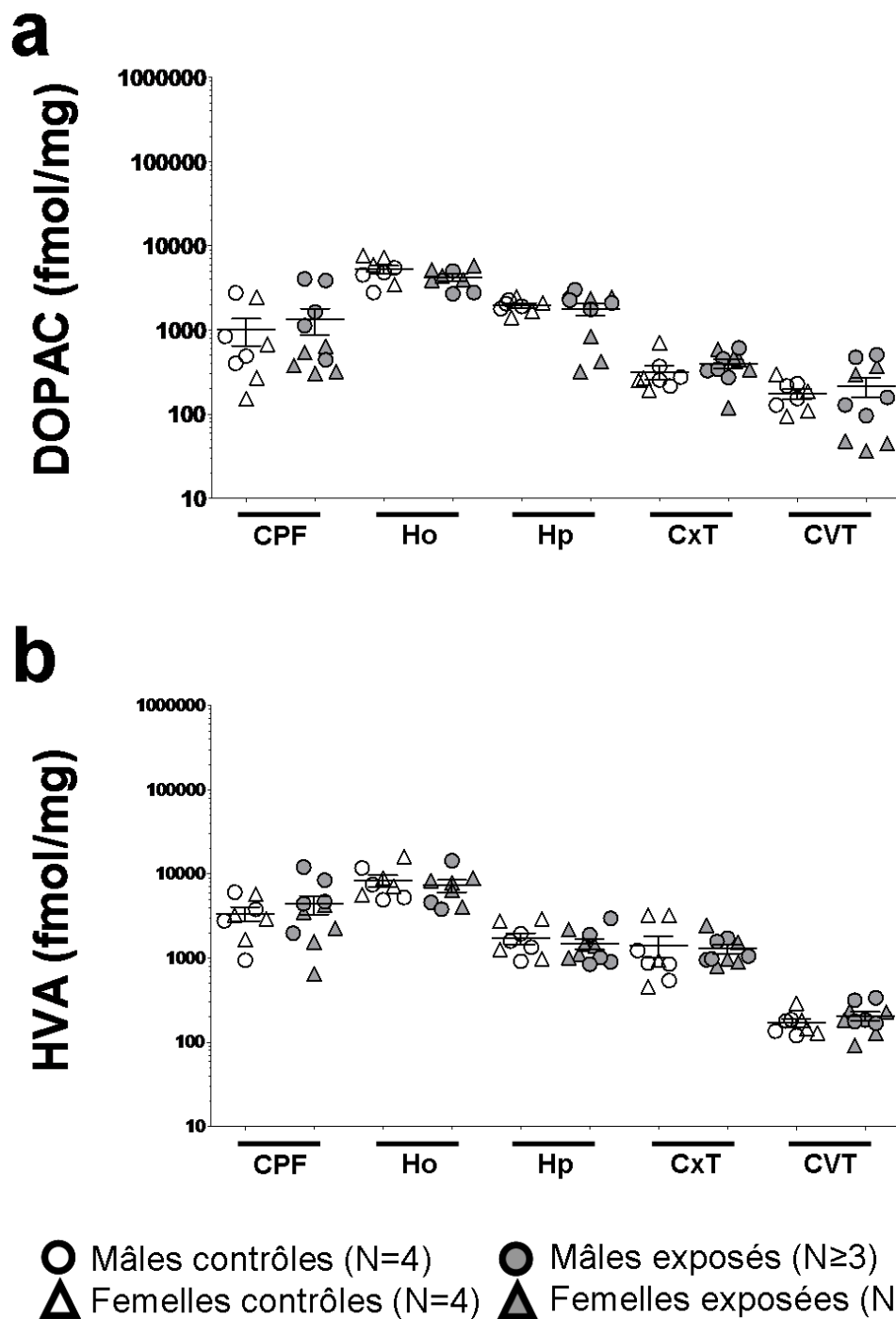


Figure C30 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les niveaux de DOPAC et HVA centraux chez les adultes F1. Représentation graphique du niveau de DOPAC (a.) et de HVA (b.) au niveau de diverses structures cérébrales chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N≥3 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HVA** : Acide homovanillique ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **CVT** : Cervelet.

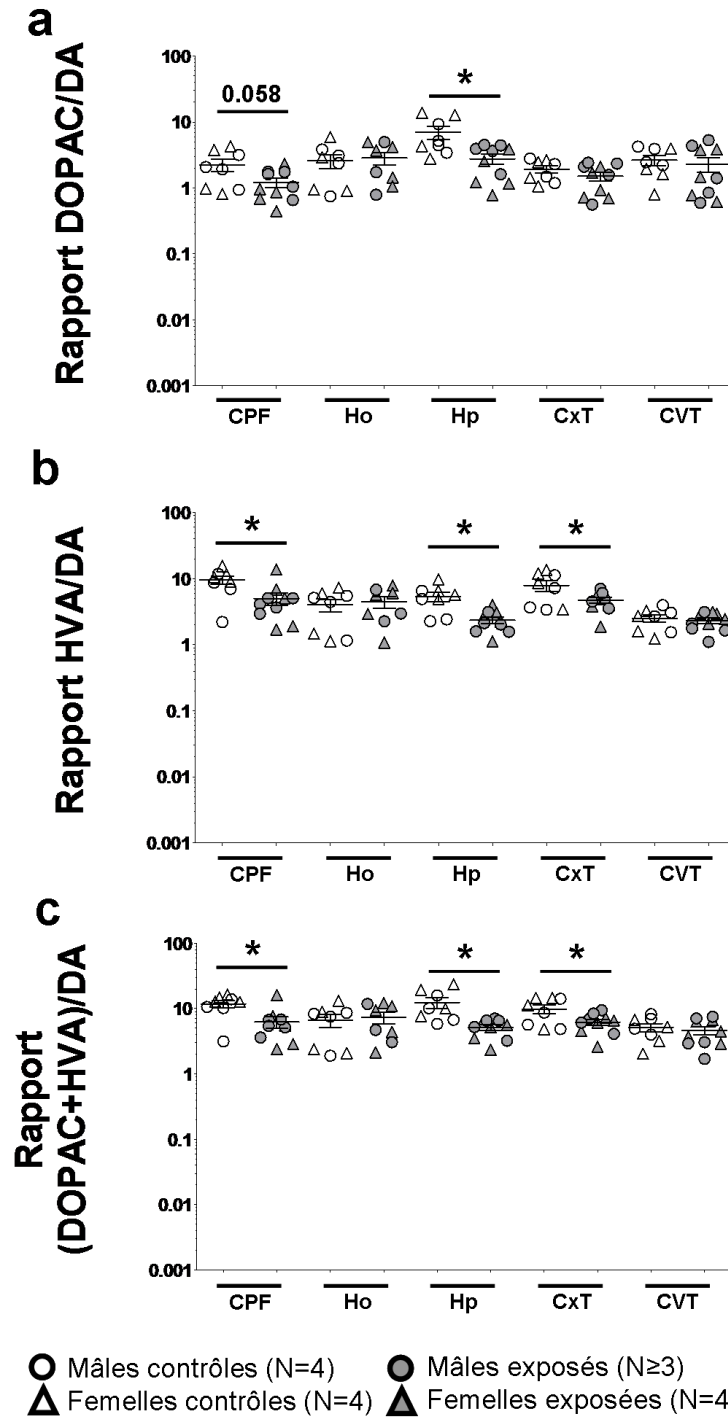


Figure C31 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur les rapports dopaminergiques centraux chez les adultes F1. Représentation graphique des rapports DOPAC/DA (a.), HVA/DA (b.) et (DOPAC+HVA)/DA (c.) au niveau de diverses structures cérébrales chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N≥3 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **DA** : Dopamine ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HVA** : Acide homovanillique ; **CPF** : Cortex préfrontal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **CxT** : cortex temporal/entorhinal ; **CVT** : Cervelet.

Tableau C5. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur le système dopaminergique des adultes F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
SNc	32.7 ± 3.43 (4)	27.4 ± 4.32 (3)	36.2 ± 3.28 (4)	32.9 ± 4.45 (3)	(1, 13)	1.948	0.193	1.778	0.212	0.099	0.759
SNr	9.5 ± 2.33 (4)	5.1 ± 3.52 (3)	12.8 ± 4.28 (4)	9.5 ± 4.46 (3)	(1, 13)	1.454	0.256	1.465	0.254	0.030	0.866
VTA	30.3 ± 2.57 (4)	12.0 (1)	35.0 ± 2.42 (4)	35.4 ± 8.18 (3)	(1, 10)	15.466	0.006 **	6.304	0.040 *	6.838	0.035 *
Cd	22.1 ± 1.26 (4)	23.4 ± 1.03 (4)	22.8 ± 0.75 (5)	20.6 ± 2.60 (4)	(1, 16)	0.626	0.443	0.134	0.721	1.828	0.199
Put	22.3 ± 1.88 (4)	22.8 ± 1.80 (4)	23.2 ± 1.38 (5)	21.3 ± 2.07 (4)	(1, 16)	0.062	0.808	0.211	0.654	0.666	0.429
VP	23.1 ± 1.59 (3)	21.8 ± 3.22 (3)	24.1 ± 0.90 (5)	24.2 ± 2.43 (3)	(1, 13)	1.076	0.324	0.133	0.723	0.190	0.672
Acb	23.4 ± 1.39 (3)	24.2 ± 1.63 (3)	26.3 ± 1.10 (4)	23.3 ± 3.29 (3)	(1, 12)	0.403	0.541	0.484	0.504	1.508	0.251
CI	11.0 ± 0.95 (4)	11.6 ± 4.20 (2)	8.7 ± 2.06 (4)	10.0 ± 1.91 (3)	(1, 12)	1.287	0.286	0.274	0.613	0.041	0.844
PrL	2.1 ± 0.74 (3)	0.4 (1)	2.8 ± 0.26 (4)	2.2 ± 0.92 (3)	(1, 10)	3.402	0.108	3.003	0.127	0.759	0.413
IL	2.5 ± 2.24 (2)	0.3 (1)	2.0 ± 0.41 (4)	2.2 ± 1.16 (3)	(1, 9)	0.522	0.497	0.919	0.375	1.467	0.271

Tous les résultats sont exprimés en moyenne d'intensité relative ± ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. **Acb** : Noyau Accumbens ; **Cd** : Noyau caudé ; **CI** : Claustrum ; **ddl** : Degrés de liberté ; **IL** : Cortex infralimbique ; **PrL** : Cortex Prélimbique ; **Put** : Putamen ; **SNc** : Substance noire pars compacta ; **SNr** : Substance noire pars compacta ; **VP** : Pallidum ventral ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale

Aucune variation significative des valeurs de ce rapport n'a été observée dans l'Ho et le CVT.

L'ensemble de ces résultats a mis en évidence des variations de la neuromodulation dopaminergique reflétée par l'augmentation du taux de DA et la baisse des différents rapports des concentrations des métabolites DOPAC et HVA relativement à celui de la DA. Ces variations sont limitées aux deux régions corticales étudiées : le cortex préfrontal et le cortex temporal, suggérant une activation de la production de dopamine au niveau des fibres projetées dans ces régions sous l'effet de l'exposition aux PFD.

Il faut noter la diminution significative des valeurs des différents rapports dans l'hippocampe, sans que le taux de DA ne soit augmenté, suggérant une diminution du tonus dopaminergique dans cette région. Enfin, il faut noter que les valeurs des concentrations tissulaires de ces différentes molécules sont plus faibles chez les femelles que chez les mâles, sans qu'il y ait d'interaction avec l'exposition.

Enfin, les niveaux de DA au niveau du cervelet s'avèrent être sexe-dépendants, avec une diminution chez les femelles exposées et une augmentation chez les mâles du même groupe par rapport aux contrôles correspondants.

2.2.1.2. Approche immunohistochimique

La quantification de l'intensité relative de marquage de la TH a été réalisée dans dix régions centrales appartenant aux différentes branches du système dopaminergique, en se basant sur l'atlas stéréotaxique du rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007).

Comme il est présenté dans le tableau C5, seules des variations significatives de ce marquage ont été observées dans la VTA parmi les dix régions étudiées. Une augmentation de 32% a ainsi été mesurée chez les lapins exposés par rapport aux contrôles ($F_{(1,10)} = 15.466$, $p = 0.006$) ; ce marquage présente des différences liées au sexe ($F_{(1,10)} = 6.304$, $p = 0.040$), ainsi qu'une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,10)} = 6.838$, $p = 0.035$), avec une augmentation beaucoup plus importante chez les femelles exposées (+195%) que chez les mâles (+16%) du même groupe.

Cependant le fait de n'avoir qu'une femelle dans le groupe contrôle du fait d'aléas dans les conditions d'élevage nous oblige à prendre ce résultat avec précaution. Si ces données étaient confirmées sur d'autres animaux, la diminution du niveau de TH chez les femelles contrôles par rapport aux mâles du même groupe, qui n'est plus observée chez les animaux exposés, suggérerait un accroissement sexe-dépendant (spécifique aux femelles) du nombre de fibres dopaminergiques dans la VTA sous l'effet de l'exposition aux PFD.

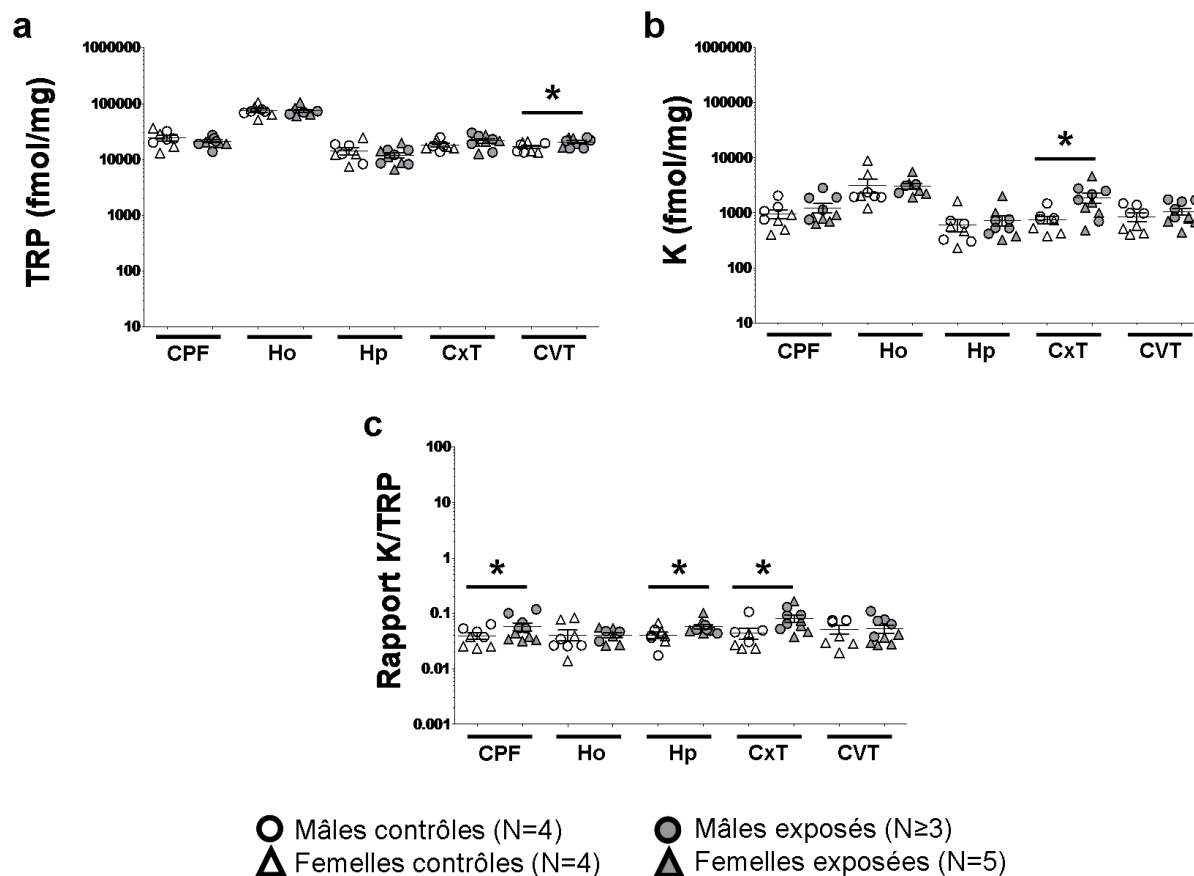


Figure C32 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la voie kynurénine centrale chez des adultes F1. Les résultats obtenus chez les adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelle ; en blanc) ou de femelles exposées (N≥3 mâles ; N=4 femelles ; en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **TRP** : Tryptophane ; **K** : Kynurénine.

2.2.2. Étude de la neuromodulation sérotoninergique

2.2.2.1. Approche neurochimique

Concernant la voie de formation de la kynurénine (K) à partir du tryptophane (TRP) (Figure C32), seules des augmentations significatives du TRP dans le CVT (+23% ; $F_{(1,17)} = 4.984$, $p = 0.042$) et de la K dans le CxT (+151% ; $F_{(1,17)} = 5.761$, $p = 0.031$) ont été observées chez les lapins exposés par rapport aux lapins contrôles ; ces augmentations ne présentent pas d'interaction entre le type d'exposition et le sexe (**CVT** : $F_{(1,17)} = 0.010$, $p = 0.922$; **CxT** : $F_{(1,17)} = 0.083$, $p = 0.778$). Enfin, aucune différence entre mâles et femelles n'a été constatée dans ces deux régions concernant ces deux molécules (**CVT** : $F_{(1,17)} = 0.408$, $p = 0.533$; **CxT** : $F_{(1,17)} = 0.480$, $p = 0.500$). Il est à noter que les niveaux de K sont plus élevés chez les mâles que chez les femelles dans le CPF ($F_{(1,17)} = 10.473$, $p = 0.006$) et le CVT ($F_{(1,17)} = 33.960$, $p < 0.001$). Aucun effet de l'exposition (**CPF** : $F_{(1,17)} = 1.257$, $p = 0.281$; **CVT** : $F_{(1,17)} = 2.688$, $p = 0.123$) et aucune interaction significative entre l'exposition et le sexe n'a été observée dans ces différentes régions (**CPF** : $F_{(1,17)} = 0.329$, $p = 0.576$; **CVT** : $F_{(1,17)} = 0.003$, $p = 0.954$) (Figure C32).

Aucune variation significative du taux de TRP et de K n'a été observée dans les autres régions explorées, que ce soit sous l'effet de l'exposition aux PFD, du sexe ou de l'interaction entre les deux.

En ce qui concerne le rapport K/TRP, l'analyse statistique a montré une augmentation significative des valeurs du rapport chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles dans le CPF (+47% ; $F_{(1,17)} = 5.271$, $p = 0.038$), l'Hp (+42%, $F_{(1,17)} = 5.071$, $p = 0.041$) et le CxT (+87%, $F_{(1,17)} = 5.021$, $p = 0.042$) (Figure C32c).

Un effet lié au sexe a été observé dans le CPF ($F_{(1,17)} = 16.663$, $p = 0.001$), avec les femelles présentant des taux plus bas que les mâles. Enfin, aucune interaction significative entre l'exposition et le sexe sur la valeur de ce rapport n'a été mesurée dans ces trois régions (**CPF** : $F_{(1,17)} = 1.639$, $p = 0.221$; **Hp** : $F_{(1,17)} = 0.061$, $p = 0.808$; **CxT** : $F_{(1,17)} = 0.324$, $p = 0.578$).

Au niveau du CVT, seul un abaissement significatif de la valeur du rapport chez les femelles par rapport aux mâles a été observé ($F_{(1,17)} = 36.963$, $p < 0.001$), sans qu'un effet de l'exposition ou de l'interaction n'ait été constaté.

Enfin, aucune variation significative du rapport liée à l'exposition, au sexe ou à l'interaction n'a été observée dans l'Ho (Figure C48c).

En ce qui concerne la voie de la sérotonine, dont le précurseur est aussi le TRP (Figure C33), aucune modification significative sous l'effet de l'exposition aux PFD, du sexe ou de l'interaction entre les deux, des taux tissulaires de 5-HT et de son métabolite, le 5-HIAA, comme des rapports 5-HT/TRP ou 5-HIAA/5-HT n'a été observée dans les cinq régions cérébrales étudiées. Seule une augmentation significative de 58% du

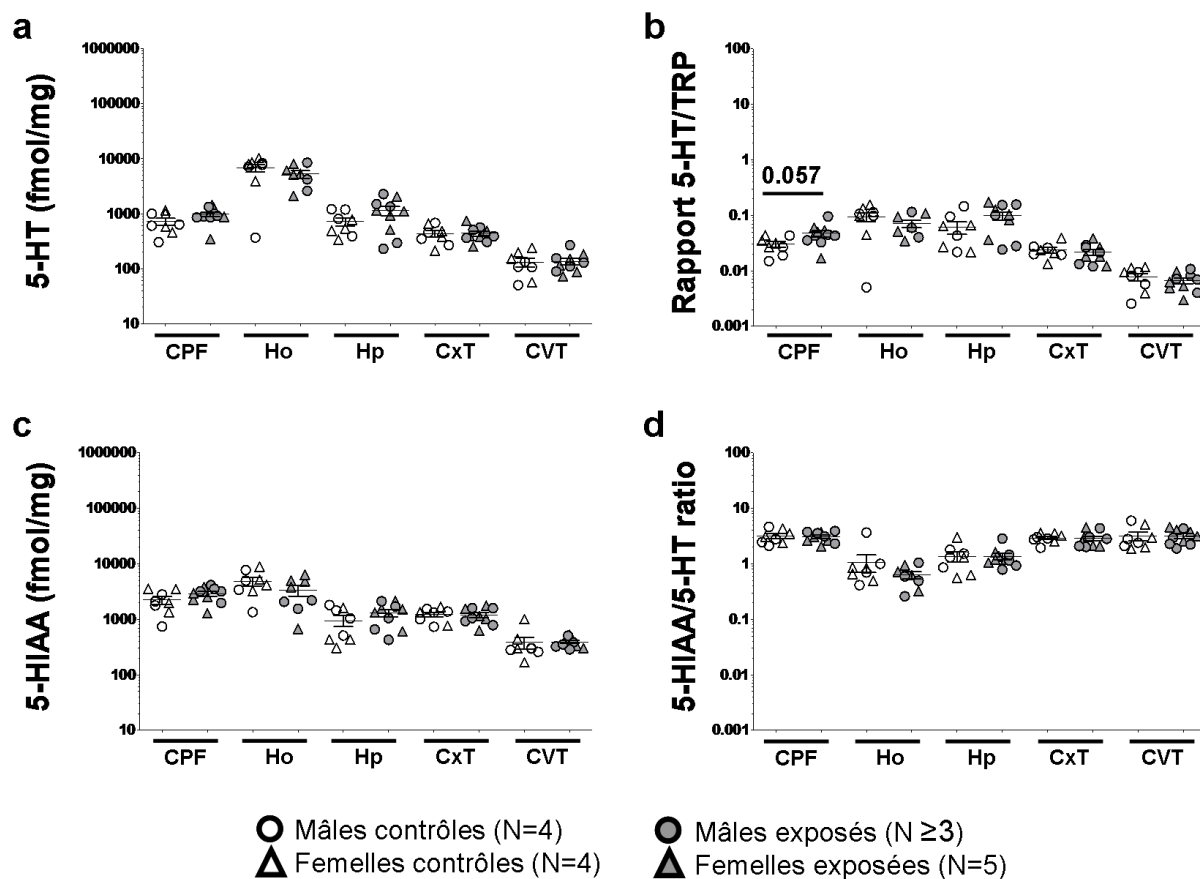


Figure C33 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur système sérotoninergique central chez des adultes F1. Les résultats obtenus chez les animaux adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **5-HT** : Sérotonine ; **5-HIAA** : 5-hydroxyindolacétique ; **TRP** : Tryptophane.

rapport 5-HT/TRP dans le CPF chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles est à noter ($F_{(1,17)} = 4.283$, $p = 0.057$) sans qu'elle soit liée au sexe ($F_{(1,17)} = 0.029$, $p = 0.866$) et sans qu'elle présente une interaction entre le type d'exposition et le sexe ($F_{(1,17)} = 0.674$, $p = 0.426$).

En conclusion, ces résultats montrent que l'exposition aux PFD module de manière localisée avant tout la voie tryptophane – kynurénine, sans modifier celle de la sérotonine. Seules les deux régions corticales et l'hippocampe montrent des variations significatives, en particulier du rapport K/TRP.

Il faut noter que ces trois régions sont celles qui ont montré une modification de la neurotransmission dopaminergique sous l'effet de l'exposition aux PFD, confirmant ainsi l'idée d'une sensibilité accrue de ces régions cérébrales pendant une exposition gestationnelle à ce type de pollution.

2.2.2.2. Approche neurochimique

La quantification de l'intensité relative de marquage TRPH⁺ a été réalisée dans diverses régions centrales (au niveau des noyaux du Raphé et dans les mêmes régions olfactives que pour la dopamine) en se basant sur l'atlas stéréotaxique de rat de George Paxinos et Charles Watson (6^{ème} édition, 2007). Malheureusement, pour des raisons techniques, cette analyse n'a pas pu être réalisée.

2.2.3. Étude de la neuromodulation noradrénergique

En ce qui concerne ce système, seule une approche neurochimique a pu être réalisée.

Celle-ci montre une augmentation significative de 44% du taux tissulaire de NA dans le CxT chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles ($F_{(1,17)} = 4.948$, $p = 0.043$), ainsi qu'une baisse de 45% de ce taux au niveau de l'Ho ($F_{(1,15)} = 4.639$, $p = 0.052$) (Figure C34a).

Aucun effet du sexe (**CxT** : $F_{(1,17)} = 0.081$, $p = 0.780$; **Ho** : $F_{(1,15)} = 2.800$, $p = 0.120$) ou d'interaction avec le facteur exposition (**CxT** : $F_{(1,15)} = 0.086$, $p = 0.774$; **Ho** : $F_{(1,15)} = 0.046$, $p = 0.834$) n'a été observé dans ces deux régions.

L'analyse statistique au niveau de l'Hp (Figure C34a) n'a révélé aucun effet significatif de l'exposition aux PFD ($F_{(1,17)} = 2.091$, $p = 0.170$) ou liée au sexe ($F_{(1,17)} = 2.889$, $p = 0.111$) sur le taux de NA. En revanche, une interaction entre le sexe de l'animal et l'exposition a été observée ($F_{(1,17)} = 5.036$, $p = 0.042$), avec une augmentation de 152% du niveau de NA chez les femelles exposées et une diminution de 13% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Enfin, aucune variation significative du taux de NA sous l'effet des trois facteurs n'a été observée dans les deux autres régions étudiées.

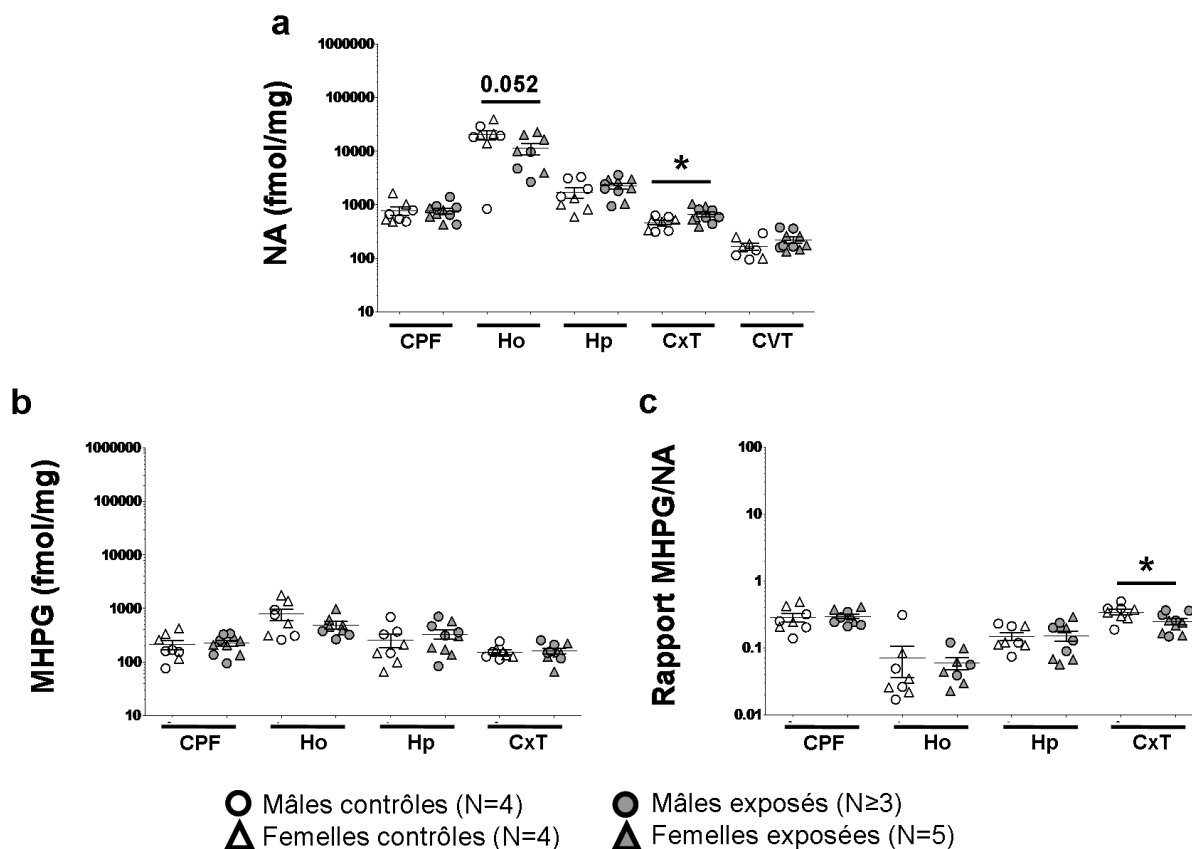


Figure C34 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur système noradrénergique central chez des adultes F1. Les résultats obtenus chez les animaux adultes issus de femelles contrôles (N=4 mâles ; N=4 femelles, en blanc) et ceux des adultes issus de femelles exposées (N=5 mâles ; N=5 femelles, en gris) sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **NA** : Noradrénaline ; **MHPG** : 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol.

L'analyse du taux de MHPG, un des métabolites de la noradrénaline, au niveau du CPF (Figure C34b) n'a révélée aucun effet significatif de l'exposition aux PFD ($F_{(1,17)} = 0.074$, $p = 0.790$) ou du sexe ($F_{(1,17)} = 2.322$, $p = 0.150$). En revanche, une tendance à l'interaction entre le sexe de l'animal et l'exposition a été observée ($F_{(1,17)} = 3.187$, $p = 0.096$), avec une diminution de 23% de ce niveau chez les femelles exposées et une augmentation de 65% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Au niveau du Hp (Figure C34b), l'analyse statistique n'a pas révélé d'effets liés à l'exposition ($F_{(1,17)} = 0.646$, $p = 0.435$). En revanche, des différences liées au sexe ont été observées, bien que non significatives ($F_{(1,17)} = 4.701$, $p = 0.063$), avec les femelles présentant des niveaux plus bas que les mâles. Aucune différence mettant en évidence une interaction entre le sexe de l'animal et l'exposition n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.622$, $p = 0.444$).

Enfin, aucune variation significative du taux de ce métabolite sous l'effet des trois facteurs n'a été observée dans les trois autres régions étudiées.

Concernant le rapport MHPG/NA (Figure C34c), aucun effet significatif de l'exposition, du sexe ou de l'interaction entre les deux n'a été observé dans chacune des régions étudiées, à l'exception des deux régions corticales : le CPF et le CxT.

L'analyse du rapport calculé pour le CPF n'a pas révélé d'effets liés à l'exposition ($F_{(1,17)} = 0.770$, $p = 0.785$). En revanche, des différences liées au sexe ont été observées ($F_{(1,17)} = 4.974$, $p = 0.043$), avec les femelles présentant des valeurs plus élevées que chez les mâles. Aucune différence mettant en évidence une interaction entre le sexe et l'exposition n'a été observée ($F_{(1,17)} = 0.299$, $p = 0.593$).

Dans le CxT, une diminution de 28% de ce rapport chez les animaux issus des femelles exposées par rapport aux animaux issus de femelles contrôles ($F_{(1,17)} = 6.176$, $p = 0.026$) ; aucune différence liée au sexe ($F_{(1,17)} = 2.532$, $p = 0.134$) ou mettant en évidence une interaction entre le sexe de l'animal et le type d'exposition n'a été observée ($F_{(1,15)} = 0.281$, $p = 0.604$).

Ces résultats montrent des variations isolées du taux de NA, du taux de MHPG ou du rapport MHPG/NA dont l'origine reste difficile à établir, ces variations étant liées soit à l'exposition, soit au sexe.

L'ensemble de ces résultats a mis en évidence une augmentation des niveaux de noradrénaline au niveau du cortex temporal et une diminution au niveau de l'hypothalamus ; la variation du niveau de NA dans l'hippocampe s'avérant être sexe-dépendante avec une augmentation chez les femelles et une diminution chez les mâles. De plus, on observe une diminution du rapport MHPG/NA au niveau du CxT.

Tableau C6a. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE des adultes F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
SNc	13.0 ± 0.84 (4)	13.5 ± 2.54 (3)	13.9 ± 0.75 (4)	14.9 ± 1.35 (3)	(1, 14)	1.031	0.334	0.408	0.537	0.038	0.849
SNr	8.4 ± 0.88 (4)	7.5 ± 2.88 (3)	9.7 ± 0.78 (4)	8.8 ± 2.00 (3)	(1, 14)	0.899	0.365	0.496	0.498	0.000	0.990
VTA	9.0 ± 1.01 (4)	9.3 (1)	10.2 ± 0.39 (4)	11.7 ± 0.99 (2)	(1, 10)	4.002	<u>0.086</u>	0.977	0.356	0.351	0.572
Cd	30.1 ± 1.60 (4)	32.5 ± 4.52 (4)	35.4 ± 2.87 (5)	28.6 ± 1.86 (5)	(1, 17)	0.076	0.787	0.796	0.387	3.280	<u>0.092</u>
Put	32.8 ± 1.47 (4)	36.8 ± 2.24 (4)	39.0 ± 2.94 (5)	34.4 ± 1.63 (5)	(1, 17)	0.920	0.354	0.016	0.902	4.675	0.048 *
VP	25.2 ± 1.01 (3)	29.9 ± 6.93 (3)	33.8 ± 1.64 (4)	27.5 ± 1.70 (4)	(1, 13)	1.340	0.274	0.084	0.778	4.249	<u>0.066</u>
AcbC	22.0 ± 1.71 (4)	25.1 ± 4.19 (3)	30.4 ± 3.10 (4)	23.5 ± 1.67 (4)	(1, 14)	2.221	0.164	0.738	0.409	4.824	<u>0.050</u>
AcbS	22.4 ± 0.17 (3)	28.8 ± 4.79 (3)	32.5 ± 2.58 (4)	24.7 ± 1.08 (4)	(1, 13)	1.940	0.194	0.109	0.749	10.670	0.008 **
Pir	11.0 ± 1.02 (4)	13.6 ± 2.13 (4)	13.8 ± 2.23 (4)	13.4 ± 0.49 (5)	(1, 16)	1.798	0.203	0.356	0.561	0.845	0.375
LSD	8.2 ± 0.76 (2)	7.0 (1)	11.1 ± 0.65 (4)	8.6 ± 1.58 (3)	(1, 9)	4.115	<u>0.089</u>	2.902	0.139	0.342	0.580
MS	20.9 (1)	15.3 (1)	25.0 ± 2.40 (4)	19.1 ± 3.22 (4)	(1, 7)	1.480	0.291	3.082	0.154	0.003	0.959
B	17.4 ± 1.94 (4)	25.5 ± 0.38 (3)	28.1 ± 2.61 (4)	21.3 ± 2.62 (4)	(1, 14)	2.739	0.126	0.113	0.744	14.206	0.003 **
Th M	10.0 ± 0.88 (4)	13.4 ± 1.10 (3)	13.0 ± 1.07 (4)	11.0 ± 2.20 (4)	(1, 14)	0.057	0.816	0.299	0.596	4.464	<u>0.058</u>
Th VM	7.7 ± 0.66 (4)	10.4 ± 1.03 (3)	9.0 ± 1.29 (4)	7.4 ± 1.18 (4)	(1, 14)	0.913	0.355	0.359	0.561	5.450	0.040 *
Th DM	20.04 ± 0.77 (4)	19.0 ± 2.47 (3)	17.9 ± 1.86 (4)	19.3 ± 1.84 (4)	(1, 14)	0.337	0.573	0.019	0.893	0.609	0.452
Th lat	7.0 ± 0.89 (4)	7.2 ± 0.54 (3)	7.4 ± 1.21 (3)	7.4 ± 0.98 (4)	(1, 13)	0.134	0.722	0.017	0.898	0.047	0.833

Tous les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu équivalent $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. **AcbC** : Noyau Accumbens, Core ; **AcbS** : Noyau Accumbens, Shell ; **B** : Noyau basal de Meynert ; **Cd** : Noyau caudé ; **ddl** : Degrés de liberté ; **LSD** : Septum latéral dorsal ; **MS** : Septum médian ; **Pir** : Cortex piriforme ; **Put** : Putamen ; **SNc** : Substance noire pars compacta ; **SNr** : Substance noire pars compacta ; **Th lat** : Thalamus latéral ; **Th DM** : Thalamus dorso-médian ; **Th M** : Thalamus médian ; **Th VM** : Thalamus ventro-médian ; **VP** : Pallidum ventral ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale.

2.2.4. Étude histochimique des activités régionales de l'acétylcholinestérase et la cytochrome oxydase

L'étude neurochimique des systèmes de neurotransmissions dopaminergique, sérotoninergique et noradrénergique au niveau de plusieurs régions centrales a été complétée par la mesure histochimique de l'activité régionale de l'acétylcholinestérase (AChE), prise comme indicateur de la différenciation neuronale, et de la cytochrome oxydase (CO), en tant que marqueur de l'activité du métabolisme énergétique cérébral.

Cette étude s'est principalement focalisée sur les régions des systèmes qui ont montré des modifications neurochimiques significatives de la neuromodulation sous l'effet de l'exposition aux PFD, à savoir, les régions de nature dopaminergique ainsi que d'autres régions de nature cholinergique. Des aires cérébrales cibles de l'innervation dopaminergique, et dans lesquelles des modifications de la neuromodulation dopaminergique ont été observées, ont été également considérées (CPF et Hp).

2.2.4.1. Acétylcholinestérase

Les résultats n'ont montré aucune variation significative de l'activité de l'AChE dans les 16 régions étudiées (Tableau C6a) sous l'effet de l'exposition aux PFD, à l'exception de tendances à l'augmentation dans la VTA (+19% ; $F_{(1,10)} = 4.002$, $p = 0.086$) dans les septums latéral et dorsal (+29% ; $F_{(1,9)} = 4.115$, $p = 0.089$) chez les animaux exposés par rapport aux animaux contrôles.

Alors qu'aucun effet lié au sexe des animaux n'a été observé dans l'ensemble des régions étudiées, des variations significatives ou tendant à l'être liées à l'interaction entre le facteur exposition et le facteur sexe ont été mesurées dans 8 des 16 régions incluant des régions cérébrales antérieures où l'innervation dopaminergique est importante (noyau caudé, putamen, pallidum ventral, noyau accumbens (core et shell), une région de nature cholinergique, le noyau basal de Meynert, et 2 aires thalamiques recevant des afférences cholinergiques, les noyaux latéral et ventromédian du thalamus (Tableau C6a).

Aucune variation significative de l'activité de l'AChE, que ce soit sous l'effet de l'exposition aux PFD ou du sexe, n'a été observée dans l'Hp, que ce soit au niveau de différentes aires de la corne d'Ammon (aires CA1, CA2 et CA3) ou le gyrus denté (Tableau 6b). Seule une interaction significative entre le type d'exposition et le sexe a été observée dans l'aire CA1 ($F_{(1,16)} = 4.269$, $p = 0.059$), qui se traduit par une diminution de l'activité AChE de 17% chez les femelles exposées et une augmentation de 25% chez les mâles du même groupe par rapport aux contrôles du même sexe.

L'analyse statistique a mis en évidence une diminution significative de 8% de l'activité AChE au niveau du cortex prélimbique (PrL) chez les animaux exposés par rapport aux lapins contrôles ($F_{(1,10)} = 6.705$, $p = 0.043$) (Tableau C6b) ; cette altération n'est pas liée

Tableau C6b. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité AChE des adultes F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
CI	4.9 ± 0.45 (4)	4.9 ± 0.60 (3)	6.6 ± 1.11 (4)	5.0 ± 0.47 (3)	(1, 12)	1.398	0.267	1.211	0.300	1.087	0.324
PrL	6.3 ± 0.41 (4)	8.5 (1)	6.8 ± 0.38 (4)	5.7 ± 0.55 (3)	(1, 10)	6.075	0.043 *	1.320	0.288	12.836	0.009 **
IL	6.7 ± 0.22 (4)	6.5 (1)	7.4 ± 0.45 (4)	5.7 ± 0.52 (2)	(1, 9)	0.014	0.910	3.747	0.101	2.466	0.167
Cg1	4.5 ± 0.80 (4)	4.0 ± 0.37 (4)	4.9 ± 0.35 (5)	3.6 ± 0.22 (5)	(1, 11)	0.000	0.995	4.791	0.060	0.971	0.353
M1	4.5 ± 0.69 (4)	3.9 ± 0.18 (4)	4.0 ± 0.16 (5)	3.4 ± 0.13 (5)	(1, 12)	0.577	0.467	1.925	0.199	0.002	0.968
M2	4.3 ± 0.74 (3)	4.0 ± 0.34 (4)	4.1 ± 0.12 (4)	3.6 ± 0.18 (4)	(1, 12)	0.803	0.394	0.901	0.367	0.110	0.748
cg	6.7 ± 0.14 (4)	7.5 ± 0.54 (3)	7.5 ± 0.78 (3)	6.4 ± 0.58 (4)	(1, 12)	0.106	0.753	0.050	0.829	3.696	<u>0.087</u>

Tous les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu équivalent $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. **Cg1** : Cortex cingulaire, aire 1 ; **cg** : Cingulum ; **CI** : Claustrum ; **ddl** : Degrés de liberté ; **IL** : Cortex infralimbique ; **PrL** : Cortex Prélimbique ; **M1** : Cortex moteur primaire ; **M2** : Cortex moteur secondaire.

au sexe ($F_{(1,10)} = 1.320$, $p = 0.288$) alors qu'une interaction significative entre le type d'exposition et le sexe a été mise en évidence ($F_{(1,10)} = 12.836$, $p = 0.009$), qui se traduit par une diminution de 33% chez les femelles exposées et une augmentation de 8% chez les mâles exposés par rapport aux contrôles du même sexe.

Au niveau du cingulum (cg), aucun effet significatif lié à l'exposition ($F_{(1,12)} = 0.106$, $p = 0.753$) ou au sexe ($F_{(1,12)} = 0.050$, $p = 0.829$) n'a été mesuré (Tableau C6b). En revanche, une tendance à l'interaction entre les 2 facteurs de variation a été observée ($F_{(1,12)} = 3.696$, $p = 0.087$), avec une diminution de 15% chez les femelles exposées et une augmentation de 12% chez les mâles du même groupe par rapport aux contrôles du même sexe.

Aucune autre différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux dans les autres structures d'intérêt (Tableaux C6). Enfin, la mesure des signaux issus du cortex temporal n'a pas pu être réalisée pour des raisons techniques, liées au faible marquage AChE dans cette région, ce qui n'a pas permis de réaliser une quantification fiable dans cette structure cérébrale.

2.2.4.2. Cytochrome oxydase

Les résultats concernant les variations de l'activité de cette enzyme dans les mêmes régions que celles mesurées pour l'AChE sont présentés dans le tableau C7.

Il a été observé une tendance à l'augmentation de 27% de cette activité dans la VTA ($F_{(1,13)} = 3.471$, $p = 0.092$), ainsi qu'une tendance à la diminution dans le thalamus latéral (-18%, $F_{(1,14)} = 3.714$, $p = 0.080$) chez les lapins exposés par rapport aux animaux contrôles (Tableau C7).

Des valeurs significatives plus élevées ou tendant à l'être ont été mesurées chez les femelles par rapport aux mâles dans la substance noire *pars compacta* et les aires dorso-médiane et latérale du thalamus. Enfin, un seul effet significatif lié à l'interaction entre le sexe et le type d'exposition a été observé dans le thalamus latéral.

Concernant les aires corticales préfrontale et temporale ainsi que l'hippocampe, aucune variation significative de l'activité de la CO n'a été observée sous l'effet de l'exposition aux PFD ou à l'interaction entre l'exposition et le sexe. Seule des différences liées au sexe ont été constatées au niveau des aires CA1 et CA2 de l'Hp (**CA1** : $F_{(1,14)} = 6.359$, $p = 0.026$; **CA2** : $F_{(1,14)} = 2.765$, $p = 0.012$), avec les femelles présentant des niveaux plus importants que les mâles. Aucun effet dû au sexe n'a été observé dans les deux régions corticales considérées.

En conclusion, le marquage histochimique de l'activité de l'AChE et de la CO a permis de montrer une modification de ces deux marqueurs de l'activité fonctionnelle cérébrale dans l'aire tegmentale ventrale, aire dopaminergique dans laquelle une augmentation du marquage de la TH a été observée sous l'effet de l'exposition aux PFD. Ces résultats

Tableau C7. Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité CO des adultes F1

	Contrôles		Exposés		ddl	Effets liés à l'exposition		Effets liés au sexe		Interaction sexe*exposition	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		F	p	F	p	F	p
SNc	22.0 ± 1.29 (4)	30.7 ± 4.13 (3)	26.0 ± 4.43 (4)	27.8 ± 1.24 (3)	(1, 13)	0.039	0.848	3.471	<u>0.092</u>	1.545	0.242
SNr	24.1 ± 1.10 (4)	22.3 ± 5.08 (3)	27.0 ± 4.04 (4)	27.0 ± 2.60 (3)	(1, 13)	1.735	0.217	0.086	0.775	0.095	0.764
VTA	18.0 ± 2.26 (4)	20.8 (1)	22.0 ± 1.75 (4)	26.8 ± 0.06 (2)	(1, 10)	4.781	<u>0.065</u>	2.646	0.148	0.182	0.682
Cd	43.5 ± 6.56 (4)	46.2 ± 3.69 (4)	43.4 ± 4.837 (5)	41.8 ± 2.67 (4)	(1, 16)	0.279	0.606	0.017	0.899	0.260	0.619
Put	32.8 ± 5.76 (4)	35.4 ± 2.09 (4)	37.2 ± 4.68 (5)	32.3 ± 3.29 (4)	(1, 16)	0.029	0.867	0.086	0.774	0.982	0.340
VP	33.8 ± 3.96 (3)	34.7 ± 6.79 (3)	30.6 ± 3.84 (5)	32.9 ± 2.89 (3)	(1, 13)	0.421	0.513	0.160	0.698	0.028	0.870
Acb	31.7 ± 4.04 (3)	32.5 ± 4.49 (3)	34.0 ± 5.45 (4)	31.4 ± 3.02 (3)	(1, 12)	0.023	0.882	0.049	0.830	0.176	0.685
LS	39.2 ± 6.54 (3)	34.7 ± 6.79 (3)	37.2 ± 4.78 (4)	37.2 ± 1.56 (3)	(1, 12)	0.091	0.770	0.011	0.917	0.010	0.922
Pir	47.8 ± 7.39 (4)	50.6 ± 5.26 (4)	52.7 ± 4.11 (5)	49.9 ± 4.33 (4)	(1, 16)	0.194	0.667	0.000	0.999	0.367	0.555
Th VM	43.4 ± 1.16 (4)	53.7 ± 4.19 (3)	43.2 ± 2.76 (4)	43.2 ± 4.94 (4)	(1, 14)	3.166	0.103	2.935	0.115	2.954	0.114
Th DM	32.8 ± 2.17 (4)	42.4 ± 4.09 (3)	32.7 ± 1.48 (4)	35.9 ± 3.68 (4)	(1, 14)	1.739	0.214	6.693	0.025 *	1.663	0.224
Th lat	17.3 ± 2.59 (4)	31.5 ± 3.86 (3)	20.6 ± 2.87 (4)	18.0 ± 3.19 (4)	(1, 14)	3.714	<u>0.080</u>	4.771	<u>0.051</u>	10.198	0.009 **

Tous les résultats sont exprimés en fmol/mg de tissu équivalent ± ESM. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01. Le nombre d'animaux utilisés pour l'analyse statistique par groupe et par sexe sont indiqués entre parenthèses après mention des valeurs moyennes et d'écart-type. . **Acb** : Noyau Accumbens ; **Cd** : Noyau caudé ; **ddl** : Degrés de liberté ; **LS** : Septum latéral ; **Pir** : Cortex piriforme ; **Put** : Putamen ; **SNc** : Substance noire pars compacta ; **SNr** : Substance noire pars compacta ; **Th lat** : Thalamus latéral ; **Th DM** : Thalamus dorso-médian ; **Th VM** : Thalamus ventro-médian ; **VP** : Pallidum ventral ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale.

confirment donc une susceptibilité à l'âge adulte de la neuromodulation dopaminergique au niveau de cette région appartenant au circuit de récompense alors que les aires dopaminergiques relevant des voies motrices n'ont pas été affectées.

De la même manière, les résultats mesurés dans plusieurs autres régions souscorticales (noyau caudé, putamen, pallidum ventral, noyau accumbens) relevant des voies dopaminergiques confirment cette susceptibilité.

Le thalamus semble être également une région du cerveau sensible aux PFD à l'âge adulte comme le montrent les effets sexe-dépendants de l'exposition sur ces deux activités dans plusieurs aires thalamiques.

Enfin, des variations significatives de l'AChE ont été observées dans l'aire CA2 de l'hippocampe et le cortex prélimbique, structures corticales ou apparentées au cortex où la neuromodulation dopaminergique est apparue modifiée chez les animaux exposés aux PFD lors de la gestation.

L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans l'encadré 13.

L'ensemble des résultats présentés dans la section expérimentale est récapitulé dans l'encadré 14, en regard des données chez le fœtus.

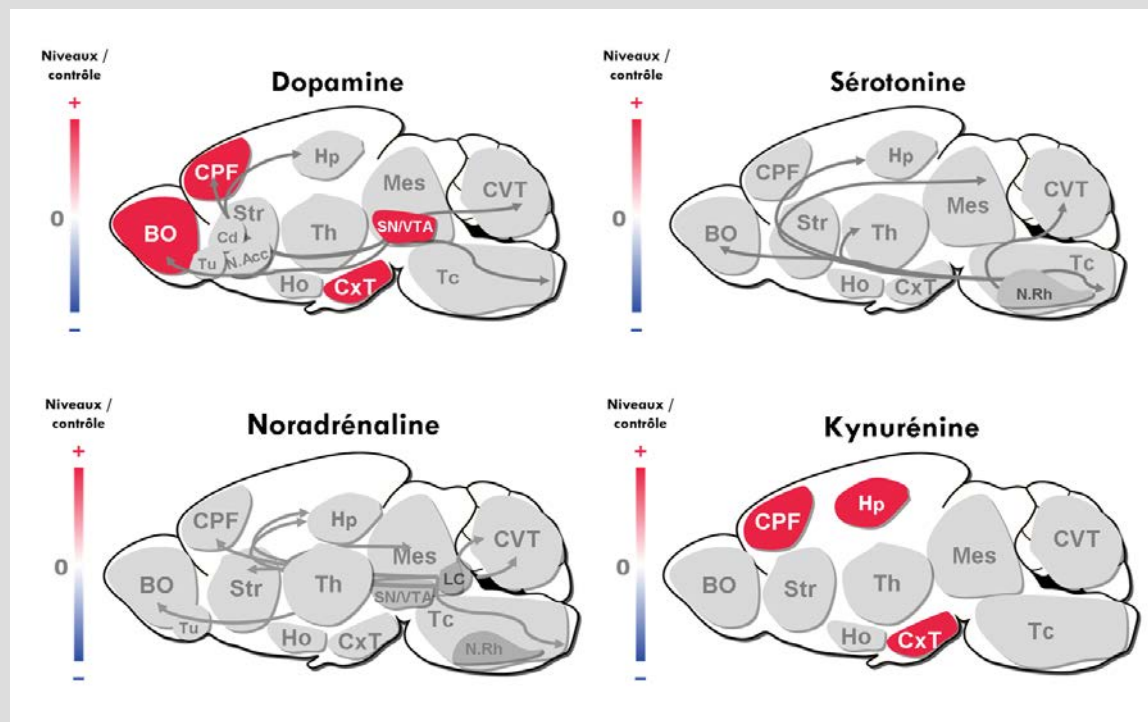
En conclusion, les effets chez l'adulte semblent moins marqués, malgré une persistance de désordres dopaminergiques qui ne semble pas être associé à de problèmes dans les comportements à base olfactive tels que nous les avons conduits à deux âges différents (encadré 14). Cependant, le faible nombre d'échantillons pour évaluer la neurochimie de certaines structures cérébrales rend délicate l'interprétation des données, en particulier pour ce qui a trait aux effets liés au sexe.

Encadré 13 : Conséquences d'une exposition gestationnelle aux PFD sur les systèmes neuromodulateurs des adultes de la génération F1

Les principaux résultats de l'étude de la **neuromodulation centrale** indiquent que les animaux exposés présentent des dérégulations importantes de la **voie dopaminergique**, principalement dans des régions relevant de la **voie mésocorticolimbique** qui est impliquée dans les processus cognitifs et attentionnels.

Concernant les **systèmes noradrénergique** et **sérotoninergique**, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'animaux.

De façon intéressante, ont été observées des dérégulations dans la voie tryptophane – kynurénine, voie qui semble impliquée dans divers mécanismes menant à l'altération de fonctions cognitives et à l'émergence de troubles psychiatriques (Savitz et al., 2015 ; Meier et al., 2016 ; Zhou et al., 2018).

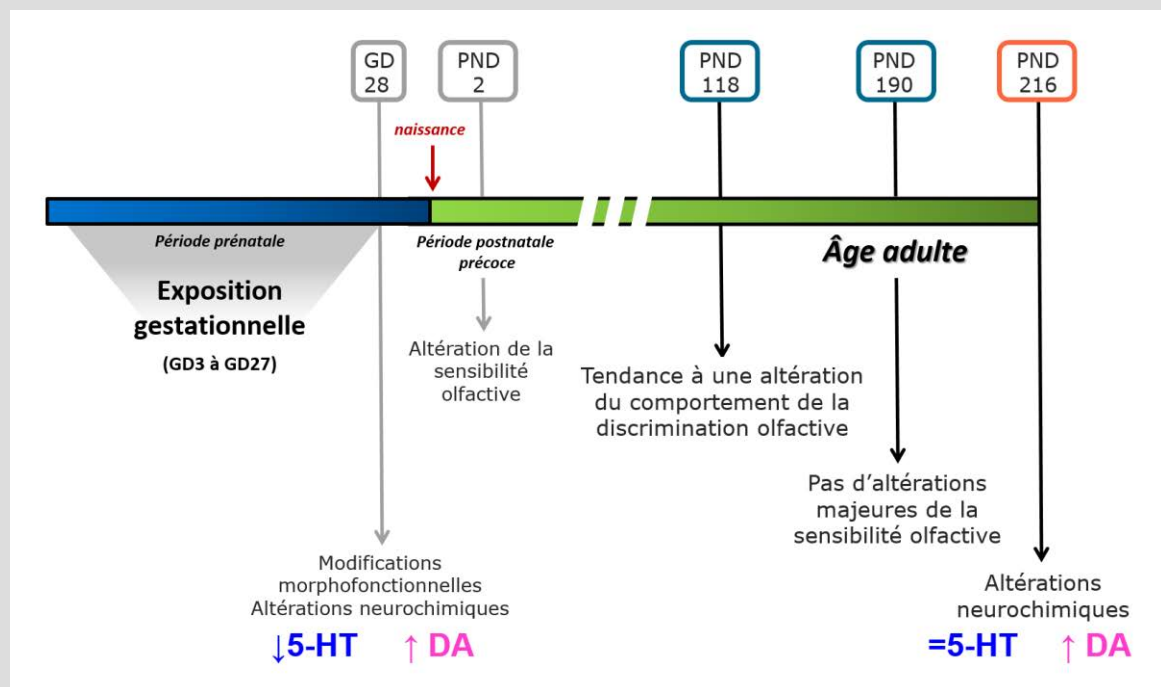


Présentation schématique des résultats obtenus sur les systèmes neuromodulateurs adulte. Acb : Noyau Accumbens ; BO : Bulbe Olfactif ; Cd : Caudé ; CPF : Cortex Préfrontal ; CVT : Cervelet ; CxT : Cortex Temporal/Entorhinal ; HdB : Bande diagonale de Broca (noyau horizontal) ; Ho : Hypothalamus ; Hp : Hippocampe ; LC : Locus Coeruleus ; Mes : Mésencéphale ; N.Rh : Noyaux du Raphé ; SN/VTA : Substance noire/ Aire tegmentale Ventrale ; Str : Striatum ; Tc : Tronc Cérébral ; Th : Thalamus ; Tu : Tubercule olfactif ;. Image inspirée de Dos Santos Coura & Granon, 2012.

Encadré 14 : Synthèse des résultats obtenus chez les adultes ayant subi une exposition gestationnelle aux PFD

En ce qui concerne [le test de discrimination olfactive](#), réalisé à PND118 et à PND190, les résultats obtenus suggèrent que les animaux *mâles exposés* **discriminent sans difficulté** l'odeur de foin (considéré, ici, odeur alimentaire).

Concernant les études [neurochimiques et immunohistochimiques](#), réalisées à PND216, les résultats mettent en évidence des **altérations importantes** du *système dopaminergique* à l'âge adulte. Le *système sérotoninergique*, quant à lui, ne présente **pas d'altérations majeures** chez les animaux adultes, contrairement à ce qui avait été observé au stade fœtal.



SECTION CONCLUSIVE

Discussion, conclusion et perspectives

<u>1</u>	L'exposition gestationnelle répétée aux PFD affecte le développement neurodéveloppemental au stade fœtal	121
<u>2</u>	L'exposition gestationnelle répétée aux PFD affecte le développement neurodéveloppemental de la descendance	132
<u>3</u>	L'exposition gestationnelle aux PFD semble mener à des altérations sexe-dépendantes des systèmes neuromodulateurs	136
<u>4</u>	Pertinence et limitations de l'étude	137
<u>5</u>	Conclusion générale et perspectives	141

1. L'exposition gestationnelle répétée aux PFD affecte le développement neurodéveloppemental au stade fœtal

Les principaux résultats obtenus montrent que les animaux qui ont subi une exposition gestationnelle répétée aux PFD présentent des perturbations précoces du développement et du maintien des circuits neuronaux **centraux et périphériques**. Ainsi, les résultats obtenus chez les fœtus sacrifiés à GD28 mettent en évidence : **1) la présence d'amas de taille nanoparticulaire** (5-20 nm de diamètre) au niveau des tissus olfactifs des fœtus exposés, **2) des déstructurations majeures des tissus olfactifs**, ainsi qu'une condensation et une marginalisation de la chromatine de différents types cellulaires qui les constituent, ainsi que **3) des altérations importantes des systèmes sérotoninergique et dopaminergique** au niveau du BO, du CPF, du CxT et du Hp. Malheureusement, à ce stade, il n'est pas possible de confirmer la nature des particules trouvées dans les tissus olfactifs, ni de déterminer les voies de signalisation et les mécanismes potentiellement affectés menant à la dérégulation de ces voies monoaminergiques.

Cette exposition mène également à des **modifications comportementales précoces de la sensibilité olfactive** chez les lapereaux issus de mères exposées à PND2, bien qu'il ne soit pas possible de faire un lien direct entre les perturbations anatomo-fonctionnelles du système nerveux au stade fœtal GD28 et les atteintes comportementales au stade post-natal PND2.

Dans l'ensemble, cette étude démontre qu'une exposition gestationnelle aux PFD mène à des changements précoces du développement neuronal, ce qui peut être indicatif de dérégulations importantes dans la mise en place et le maintien des circuits neuronaux centraux et périphériques des individus issus de mères exposées.

1.1. Les particules de fumées de moteur diesel semblent atteindre les structures olfactives fœtales

1.1.1. Des dépôts particuliers de taille nanométrique sont présentes dans les tissus olfactifs des animaux exposés

Les résultats des études structurales présentées ici indiquent que les animaux exposés aux PFD pendant la gestation présentent une accumulation de dépôts de type particulaire au niveau de la MO et du BO fœtal, dont le diamètre individuel est estimé entre 5 et 20 nm selon le tissu, alors que le diamètre moyen des particules inhalées était de 69 nm.

Ainsi, nos résultats démontrent pour la première fois la présence physique de « particles-like » dans les tissus olfactifs fœtaux suite à une exposition répétée et contrôlée aux PFD chez la mère, exposition qui est représentative de celle rencontrée par l'homme dans des zones urbaines. En effet, la plupart des observations faites jusqu'à présent ont été réalisées soit après une exposition dans des conditions non-

contrôlées (sur des échantillons de cerveau post mortem d'enfants et de jeunes adultes habitant dans différentes zones polluées de Mexico (Calderón-Garcidueñas et al, 2010) ou dans le cerveau de chiens issus des mêmes quartiers (Calderón-Garcidueñas et al, 2008b)), soit dans des conditions contrôlées, mais non représentatives d'une exposition urbaine (suite à l'administration intratrachéale de UFPM manufacturées chez le rongeur, par exemple (Elder et al, 2006 ; Nemmar et al, 2001)).

Nos résultats ainsi que ceux d'autres études (Bencsik et al., 2018 ; Elder et al., 2006; Oberdorster et al., 2004, 2009 ; Costa et al., 2014 ; Davis et al., 2013 ; Donaldson et al, 2005 ; Ema et al, 2013 ; Hougaard et al, 2008, 2015 , Ibanez et al, 2014 ; Kinoshita et al, 2008 ; Klocke et al, 2017 ; Sugamata et al, 2006a, 2006b) confirment la capacité des PFD à pénétrer dans l'organisme et posent naturellement la question de leur toxicité et leur capacité à induire des altérations tissulaires, question à laquelle peu d'études ont été consacrées jusqu'à présent (Blunk et al, 1993 ; Gerlofs-Nijland et al, 2010 ; Lück et al, 1998 ; Maher et al, 2016). Il est à noter que la taille des particules retrouvées dans les tissus olfactifs est inférieure à la moyenne de celle des particules inhalées et que leur diamètre semble diminuer au fur et à mesure que l'on pénètre dans les tissus olfactifs en direction du SNC : il est possible que seules les particules les plus nanométriques aient atteint les tissus olfactifs, les autres ayant été filtrées par les défenses tissulaires, ou que des transformations successives aient modifié leur taille et leur niveau d'agrégation. Ces observations sont en faveur d'une possible biotransformation physicochimique des particules au cours de leur pénétration tissulaire, suite à leur prise en charge par les voies d'élimination, ce qui modifie leur taille, leur enrobage de surface et/ou les interactions, et pose aussi la question de l'évolution de leur toxicité au regard de cette biotransformation (Albanese et al., 2012 ; Duan et Li, 2013 ; Genter et al., 2009; Ruiz et al., 2015 ; Yokel, 2016). Cependant, nous n'avons pas recherché si ces particules étaient encore présentes dans les structures plus centrales des fœtus exposés, ni pu les caractériser sur le plan chimique pour faire un lien direct entre les amas observés et les particules inhalées, d'où le terme de « particles-like » utilisé dans l'article (Annexe 5) et ce document.

1.1.2. Plusieurs voies non exclusives de transport des particules vers les tissus olfactifs des animaux exposés sont possibles

Nos résultats soulèvent la question de la voie empruntée par les particules pour atteindre les tissus olfactifs fœtaux, à savoir la voie hématogène et/ou la voie amniotique. En effet, étant donné que le système olfactif, en particulier la MO, est fortement vascularisé, et que les travaux de Valentino et collaborateurs (2016a), réalisés sur les mêmes animaux, ont mis en évidence des agrégats de particules au niveau des vaisseaux sanguins de la mère et des fœtus, il est probable que des particules aient été transportées dans les organes olfactifs du fœtus par la circulation systémique suite à un transfert placentaire. Ceci pourrait expliquer qu'elles soient détectées à différents

niveaux de la MO et du BO, voire au niveau cérébral du fait d'une BHE affaiblie par la neuroinflammation, par exemple. Néanmoins, la MO fœtale est également en contact direct avec le liquide amniotique, dont on sait qu'il est potentiellement contaminé par des substances issues de l'environnement maternel. En effet, une étude récente menée chez des femmes enceintes fumeuses ([Machado et al, 2014](#)) a montré que plusieurs substances du tabac peuvent être transférées au fœtus non seulement par le sang du cordon ombilical, mais aussi par le liquide amniotique. De ce fait, les particules pourraient ainsi se déposer au niveau de la MO par le mucus nasal, et migrer vers le cerveau par le BO en remontant par les axones olfactifs, *via* la « route olfactive » décrite par Doty pour différents agents environnementaux ([2008](#)).

L'hypothèse d'une voie amniotique s'appuie aussi sur le fait que les « particles-like » sont trouvés dans les cils et les dendrites des neurones sensoriels olfactifs, ce qui est en faveur d'une internalisation des particules dans les dendrites *via* le contact avec le liquide amniotique, et non depuis les vaisseaux sanguins qui sont localisés en sous-muqueuse. De plus, ces « particles-like » ont été observées non seulement isolées (en contact avec les cils olfactifs), mais également concentrées dans des vésicules de type lysosomal au niveau des diverses structures olfactives. Cette dernière observation fait penser à un phénomène de « transcytose » (type de transport transcellulaire dans lequel diverses macromolécules sont transportées à travers la cellule *via* des vésicules), lequel a été récemment observé dans les cellules endothéliales et les globules rouges de chiens errants vivant dans des villes très polluées ([González-Maciel et al, 2017](#)).

Il est intéressant de remarquer que les particules ont été plutôt observées dans le placenta des lapines exposées sous des formes différentes, du type « fingerprint » ([Valentino et al, 2016a](#)), ce qui laisse penser que ce type de transport transcellulaire serait plus spécifique au tissu nerveux olfactif.

Il aurait été intéressant de mesurer les concentrations de particules dans le sang et le liquide amniotique, afin d'avoir de possibles éléments de réponse quant à l'importance relative des différentes voies de contamination. Cette démarche n'a pas été prévue dans ce projet, en raison de la nécessité de la mise au point d'outils et protocoles innovants permettant le marquage et la quantification pour des particules peu concentrées en milieu liquide.

1.2. L'exposition aux PFD entraîne l'apparition d'altérations anatomo-histologiques au niveau des tissus olfactifs

L'hypertrophie observée au niveau des axones des OSN, des PG et des Gr dans la MO et le BO fait penser à un phénomène de « swelling » qui suggère l'existence de processus inflammatoires dans les NSO, les cellules engainantes et/ou les neurones relais, ce qui a été démontré dans des études sur les effets neurotoxiques des PFD pendant la gestation dans le cervelet ([Sugamata et al, 2006a, 2006b](#)). Cependant, cette hypertrophie semble hétérogène selon les zones et au sein d'un même faisceau

d'axones. Ceci pourrait être lié à des atteintes restreintes à certaines catégories cellulaires, et/ou résulter du processus discontinu et chronique d'exposition aux PDF qui entraînerait une hétérogénéité dans les réponses cellulaires.

Afin d'avoir des éléments de réponse sur les mécanismes mis en jeu et savoir si un type cellulaire est particulièrement affecté par l'exposition, nous avons réalisé des immunomarquages contre des protéines impliquées dans les processus inflammatoires comme Iba1, ainsi que des protéines spécifiques d'un type cellulaire donné (telles que PCNA et S100 β (marqueurs des cellules basales au niveau de la MO et des cellules engainantes, respectivement), ou encore la GFAP ou la vimentine (marqueurs des astrocytes matures et immatures, respectivement)), au niveau du MO et du BO, qui n'ont pas donné des résultats exploitables. En effet, la plupart des anticorps commerciaux étant produits chez le lapin, nous avons été confrontés à une augmentation du bruit de fond et des réactions croisées avec des immunoglobulines endogènes; de plus, les anticorps produits chez la chèvre ou chez la souris que nous avons testés pour éviter les réactions croisées n'ont pas donné de signal de marquage. Il a donc été impossible par cette approche immunohistologique d'analyser les voies potentiellement altérées par l'exposition gestationnelle aux particules et d'identifier les types cellulaires impactés.

Nous avons également observé une condensation et une marginalisation de la chromatine au niveau du noyau des cellules engainantes (EOC), périglomérulaires (PG) et granulaires (Gr) dans le BO, révélant un état de stress et des signes précoces de mort cellulaire (Colín-Barenque et al., 2017). Cependant, l'analyse du niveau d'apoptose par la technique TUNEL au niveau du BO a révélé peu de différences entre les groupes ; seule une interaction entre l'exposition et le sexe a été noté dans la couche glomérulaire. Ces données sont en contradiction avec certaines études mettant en évidence des effets inflammatoires et apoptotiques liés à l'exposition aux PFD dans d'autres structures. Sugamata et collaborateurs (2006a, 2006b) ont décrit une augmentation de l'apoptose et de l'un de ses médiateurs, la caspase-3, au niveau des cellules de Purkinje, chez des souris exposées *in utero* aux PFD, ainsi que des états apoptotiques au niveau des cellules endothéliales constituant les vaisseaux cérébraux à l'âge adulte. Cette exposition induirait un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE), et mènerait à des altérations anatomiques sévères dans différentes régions du cerveau. Récemment, Bolton et collaborateurs (2017) ont démontré que l'exposition prénatale aux PFD chez la souris entraîne une augmentation du niveau de cytokines dans le tissu cérébral fœtal et altère la morphologie des cellules microgliales, ainsi que les interactions entre cellules gliales et neurones.

D'autres études révèlent que l'exposition aux polluants ambiants, dont les gaz d'échappement diesel, entraîne bien une augmentation de l'expression de cytokines et un stress oxydatif dans le striatum, mais au niveau du BO, les effets sont moins marqués (Gerlofs-Nijland et al, 2010) et peuvent être dose-dépendants (Levesque et al, 2011a).

Ces différences de résultats avec notre étude peuvent s'expliquer par la diversité des régions cérébrales étudiées, le mode d'exposition, le modèle animal, ou encore la fenêtre d'observation par rapport à la fenêtre d'exposition. Par exemple, l'exposition aux PFD a pu modifier la dynamique cellulaire des cellules matures et/ou de celles en provenance de la zone sous-ventriculaire (SVZ) pendant les premiers jours d'exposition, mais sa répétition journalière a pu mener à une régulation compensatoire dans le développement et le maintien de circuits cellulaires olfactifs en particulier. De ce fait, aucune altération majeure de cette voie n'aurait été mise en évidence à un stade plus tardif du développement (à l'occurrence au 28^e jour de gestation qui est le moment où on a effectué les analyses).

Afin de corroborer cette hypothèse et d'avoir plus d'éléments de réponse sur la mise en place et le maintien des circuits olfactifs, il aurait été intéressant de mesurer l'effet de l'exposition aux nanoparticules sur la neurogenèse *via* des injections de BrdU avant la récupération des tissus olfactifs pour tracer les précurseurs neuronaux à divers stades depuis la première exposition. Cette analyse nous aurait ainsi permis d'avoir une idée de la dynamique de renouvellement des tissus d'intérêt depuis le début de l'exposition. Toutefois, étant donné que les animaux produits dans cette expérimentation étaient mutualisés par plusieurs équipes, et qu'une de ces équipes s'intéressait à l'étude des effets de la pollution *via* des analyses épigénétiques qui risquaient d'être perturbées par la présence de BrdU, il n'a pas été possible de réaliser cette expérimentation. De plus (pour ces mêmes raisons de mutualisation), il était impossible d'envisager l'étude du développement neuronal à plusieurs stades gestationnels.

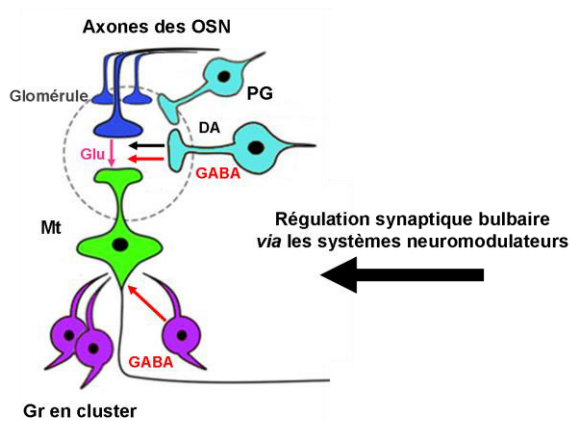
Il serait intéressant de poursuivre notre étude par RT-qPCR en ciblant les transcrits des différents types et/ou processus cellulaires, même si l'approche transcriptionnelle est peut-être peu appropriée du fait de l'atteinte chronique répétée. Une collaboration avec la plateforme de protéomique de l'université Lille (MSAP-USR 3290, CNRS) est mise en place pour mesurer la modulation par l'exposition aux PFD des profils protéomiques sur différents tissus d'intérêt de notre modèle et préciser les mécanismes d'atteinte cellulaire.

1.3. L'exposition répétée aux PFD altère la neuromodulation bulbaire chez les fœtus exposés

1.3.1. La dénervation des projections centrifuges des systèmes neuromodulateurs pourrait être à l'origine des atteintes monoaminergiques décrites

Associées aux altérations ultrastructurales, nous avons observé des modifications des systèmes monoaminergiques bulbaires, caractérisées par une diminution du niveau tissulaire de la 5-HT, une augmentation du renouvellement de la NA et une tendance à l'augmentation du niveau de DA. De plus, une augmentation significative de l'intensité de marquage de la TH au sein des cellules dopaminergiques bulbaires a été observée, ainsi

BO des foetus contrôles



BO des foetus exposés

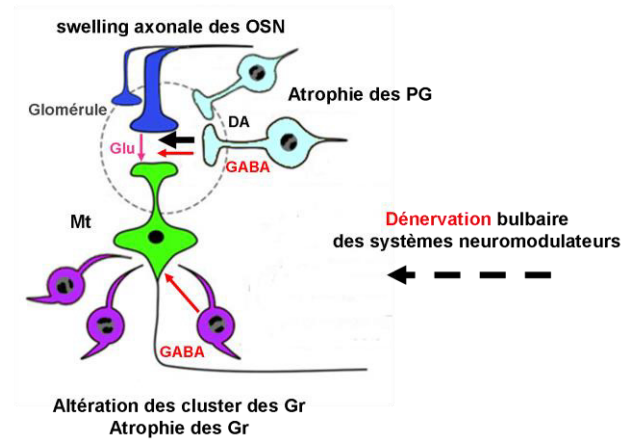


Figure D1 : Représentation schématique de l'hypothèse d'une réponse plastique compensatoire dopaminergique suite à une dénervation des autres systèmes neuromodulateurs bulbares. En situation normale (a), les afférences olfactives cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques exercent une modulation inhibitrice sur les cellules bulbares. Suite à l'exposition gestationnelle, il semblerait que ces apports cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques se voient réduits, menant ainsi à une réduction de cette modulation inhibitrice. Le résultat final est une altération de la balance excitation/inhibition bulbaire. Étant donné que les neurones périglomérulaires libèrent de la DA et du GABA, qui sont des neurotransmetteurs inhibiteurs (Mori et al. 1999) pour moduler la signalisation olfactive au sein du glomérule, une modulation à la hausse du système dopaminergique bulbaire pourrait être une réponse plastique pour compenser l'absence d'inhibition centrifuge liée à l'exposition. Inspiré de Mundiñano et al., 2011.

qu'une altération sexe-dépendante des arrivées cholinergiques au niveau du bulbe (passant par le tubercule olfactif).

Puisque les systèmes monoaminergiques participent à la discrimination et la perception des odeurs (Escanilla et al., 2009 ; Guerin et al., 2008 ; Petzold et al., 2009), les modifications neurochimiques qui accompagnent les altérations ultrastructurales bulbaires pourraient être des éléments expliquant les dysfonctionnements olfactifs observés ultérieurement chez les lapereaux.

Comme décrit dans l'introduction, les arrivées sérotoninergiques dans le BO innervent essentiellement les glomérules et modulent, à ce niveau, l'activité des PG (McLean et Shipley, 1987), alors que les fibres noradrénergiques et cholinergiques aboutissent elles pour la plupart dans la couche des Gr et dans la couche plexiforme interne (McLean et coll., 1989 ; Shipley, 1984), où elles modulent l'activité des synapses dendrodendritiques entre cellule granulaire et cellule mitrale (McLean et al., 1989 ; Castillo et al., 1999). Au vu des atteintes spécifiques que nous avons observées en MET dans les régions GL et Gr des fœtus exposés, une hypothèse qui pourrait être avancée est que la réduction des apports cholinergiques, noradrénergiques et sérotoninergiques au niveau du BO du fait de l'exposition précoce aux PFD pourrait être le résultat fonctionnel d'une altération de la balance excitation/inhibition bulbaire.

Étant donné que les neurones périglomérulaires libèrent de la DA et du GABA, qui sont des neurotransmetteurs inhibiteurs (Mori et al., 1999), une modulation à la hausse du taux tissulaire de DA et de l'intensité de marquage de la TH dans ces cellules pourrait être le reflet d'une réponse plastique visant à compenser cette absence d'inhibition centrifuge (Figure D1). Ceci est compatible avec l'hypothèse évoquée par Mundiñano et collaborateurs (2011), suggérant que l'augmentation des niveaux dopaminergiques bulbaires dans des échantillons *post mortem* de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et/ou de Parkinson est une réponse plastique compensatoire suite à une dénervation des autres systèmes neuromodulateurs bulbaires.

1.3.2. L'altération de la sensibilité olfactive des lapereaux serait consécutive à cette dénervation monoaminergique

Les altérations anatomo-fonctionnelles du BO à GD28 pourraient entraîner une modification du seuil de sensibilité à la phéromone mammaire 2MB2, molécule dont le signal est transduit et interprété par le système olfactif principal (Coureaud et al, 2004, 2010). Cependant, un lien direct ne peut être établi entre GD28 et PND2, le stade PND2 n'ayant fait l'objet ni de dosages, ni d'observations anatomo-histologiques pouvant confirmer les atteintes à la naissance. De plus, nous ne pouvons pas conclure de manière certaine sur le sens de variation de la sensibilité olfactive des animaux. En effet, comme le taux de réponse à la phéromone mammaire est concentration-dépendant et suit une courbe « en forme de cloche », avec une réactivité optimale entre 10^{-8} and 10^{-6}

g/ml (Schaal et al, 2003), la diminution du pourcentage d'animaux réagissant à la concentration de 5.10^{-8} g/ml (qui est la seule concentration à avoir été testée) peut refléter une diminution ou une augmentation du seuil de sensibilité olfactive. Dans les deux cas, ceci conduirait à un déplacement de la courbe de réponse vers l'une ou l'autre des extrémités, et seul un test olfactif à d'autres concentrations pourrait répondre au sens de modulation, ce qui n'a pas été fait ici. Cependant, au vu des altérations morphologiques et neurochimiques observées à GD28 dans le système olfactif principal, et des hypothèses formulées précédemment, nous favorisons plutôt une altération du seuil de sensibilité olfactive des nouveau-nés exposés, sans pour autant affirmer une relation de cause à effet. Par ailleurs, la littérature disponible chez les rongeurs comme chez l'homme fait état d'altérations, plutôt que d'amélioration des capacités olfactives et cognitives en lien avec l'exposition périnatale aux contaminants de l'air (Calderón-Garcidueñas et al, 2001,2008a, 2010; Levesque et al, 2011a, 2011b). On ne peut pas non plus exclure que les effets de l'exposition aux PFD sur la réponse 2MB2 ne soient pas aussi liés à des déficits moteurs, la réponse comportementale à la phéromone mettant en jeu d'autres composantes que la sensibilité olfactive.

Afin de mettre en évidence un potentiel lien entre les perturbations anatomo-fonctionnelles du système olfactif à GD28 et comportementales à PND2, il aurait été intéressant d'effectuer des analyses de la réactivité neuronale précoce par analyse de l'expression de c-fos après stimulation à la 2MB2 (Coureaud et al, 2010 ; Charra et al, 2013). Malheureusement, pour les raisons de mutualisation des animaux déjà mentionnée, et du fait qu'une des équipes impliquées s'intéresse aux effets à long terme de la pollution atmosphérique *via* un suivi du développement post-natal, il a été impossible de consacrer une partie des nouveau-nés à cette expérimentation.

Enfin, du fait des altérations sexe-dépendantes mesurées tout au long de cette étude (voir partie 4 de la section conclusive), il aurait été intéressant de sexer les animaux avant la réalisation du test comportemental pour pouvoir juger d'un effet sexe-dépendant de l'exposition aux PFD sur la sensibilité olfactive. Malheureusement, le sexage des animaux est compliqué au stade PND2, ce qui aurait prolongé le temps de séparation des petits de leur mère, raison pour laquelle il n'a pas été envisagé, le sexage ayant été effectué plus tard pour les analyses ultérieures.

1.4. Les perturbations olfactives induites par les PFD peuvent être indicatives de perturbations au niveau de structures cérébrales plus centrales

Du fait du continuum neuroanatomique et fonctionnel entre le BO et le reste du SNC, et malgré la synthèse locale de DA dans le BO, les données obtenues sur le système olfactif soulèvent la question de l'origine des atteintes neurochimiques observées sur les systèmes monoaminergiques. Étant donné que les projections des systèmes neuromodulateurs proviennent de régions centrales, les altérations neurochimiques observées ici pourraient non seulement concerner les processus

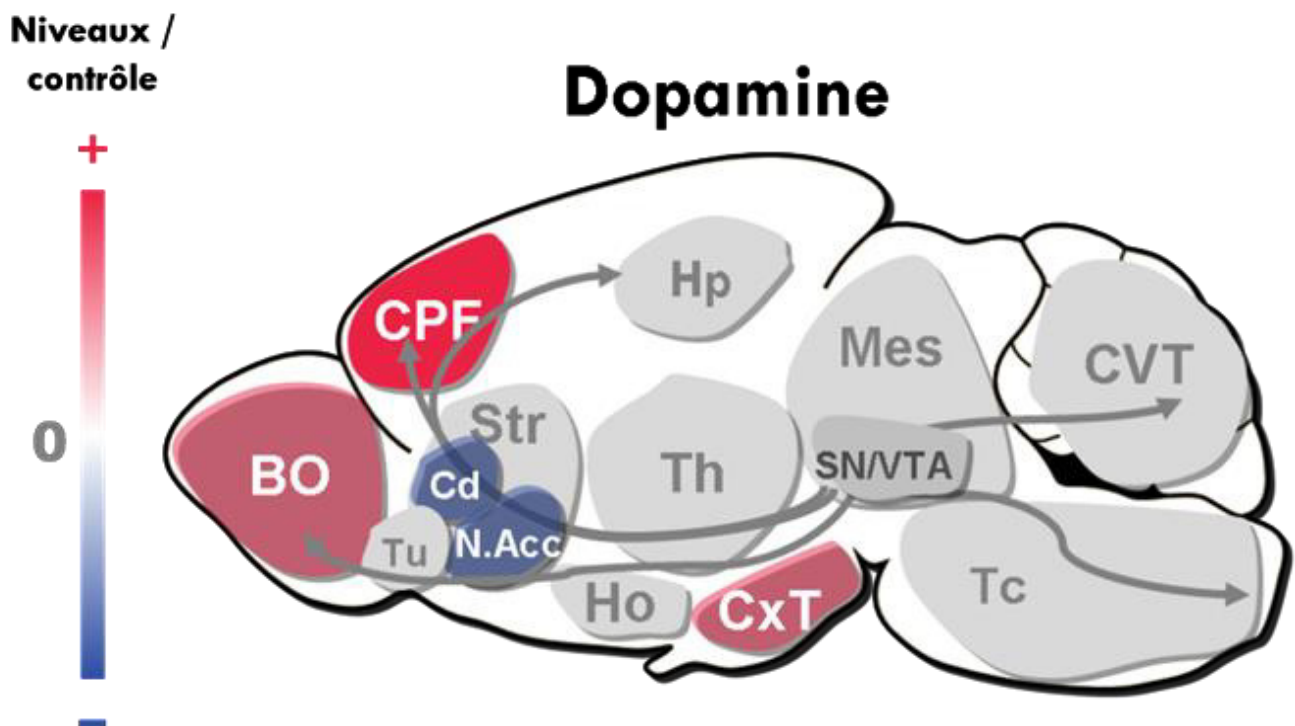


Figure D2 : Représentation schématique globale des altérations dopaminergiques observées chez les fœtus F1. L'échelle de couleur représente le sens et l'intensité de variation des altérations mesurées dans les différentes régions cérébrales chez les lapins exposés. **N.Acc** : Noyau Accumbens ; **BO** : Bulbe Olfactif ; **Cd** : Caudé ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **SN/VTA** : Substance noire/ Aire tegmentale Ventrale ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus ; **Tu** : Tubercule olfactif. Image inspirée de [Dos Santos Coura & Granon, 2012](#).

olfactifs, mais pourraient être indicatifs de perturbations au niveau de structures cérébrales plus intégratives (Calderón-Garcidueñas et al, 2008a, 2008b ; Doty et al, 2012a, 2012b ; Rey et al, 2018 ; Peters et al, 2006).

Ces éléments nous ont ainsi conduits à caractériser les effets centraux de l'exposition aux PFD afin de confronter les possibles atteintes centrales aux modulations observées dans le système olfactif.

1.4.1. L'exposition gestationnelle répétée aux PFD altère la modulation dopaminergique centrale chez les fœtus exposés

La diminution de l'intensité de marquage TH mesurée dans le Cd et l'Acb chez les fœtus exposés va dans le même sens que celle décrite par Yokota et collaborateurs (2009), qui observent une diminution des niveaux de DA dans le noyau accumbens et le striatum (Str) chez des souris mâles exposées *in utero* aux PFD, accompagnée une modification de leur activité motrice. De plus, dans le CPF et le CxT, les niveaux de DA sont augmentés et s'accompagnent d'altérations des niveaux de ses deux métabolites principaux (HVA et DOPAC), résultats qui sont en accord avec ceux de Takahashi et collaborateurs (2010) qui montrent que les souris mâles exposées *in utero* aux nanoparticules de TiO₂ présentent, à six semaines de vie post-natale, des niveaux plus élevés de DA et de ses métabolites dans le CPF et le Str. En outre, la variation des niveaux de DA hippocampiques s'avère être différente selon le sexe des animaux (augmentation chez les femelles exposées et diminution chez les mâles), de même que les niveaux de DA au niveau du Tc, mais en sens inverse de variation.

Etant donné que plusieurs rapports ont démontré que l'altération des taux de métabolites de DA est indicative d'altérations de la neurotransmission dopaminergique cérébrale (Saraswat et al., 1981; Narita et al., 1993), l'ensemble des résultats présentés ici suggère que l'exposition prénatale aux PFD pourrait mener à des perturbations du système dopaminergique central, qu'il s'agisse de la voie mésocorticolimbique et/ou de la voie nigrostriée, qui innervent toutes les deux le BO (Doty, 2012a ; Höglinger et al., 2015) (Figure D2).

La question qui peut alors être posée est de savoir si ces modifications sont la conséquence de perturbations dopaminergiques observées au niveau du bulbe (voie centripète) en présence des PFD et/ou la résultante de la présence de particules dans ces régions centrales. Cette question est d'autant plus pertinente que les variations neurochimiques dopaminergiques centrales sont comparables à celles observées au niveau bulbaire.

Bien que nous n'ayons pas étudié la présence de particules dans ces régions du SNC des fœtus exposés, les données bibliographiques comme celles présentées dans ce manuscrit évoquent un possible lien entre exposition aux PFD et toxicité directe dopaminergique. En effet, la toxicité directe des particules sur les neurones dopaminergiques a été rapportée *in vitro* (Block et al., 2004), induisant des lésions

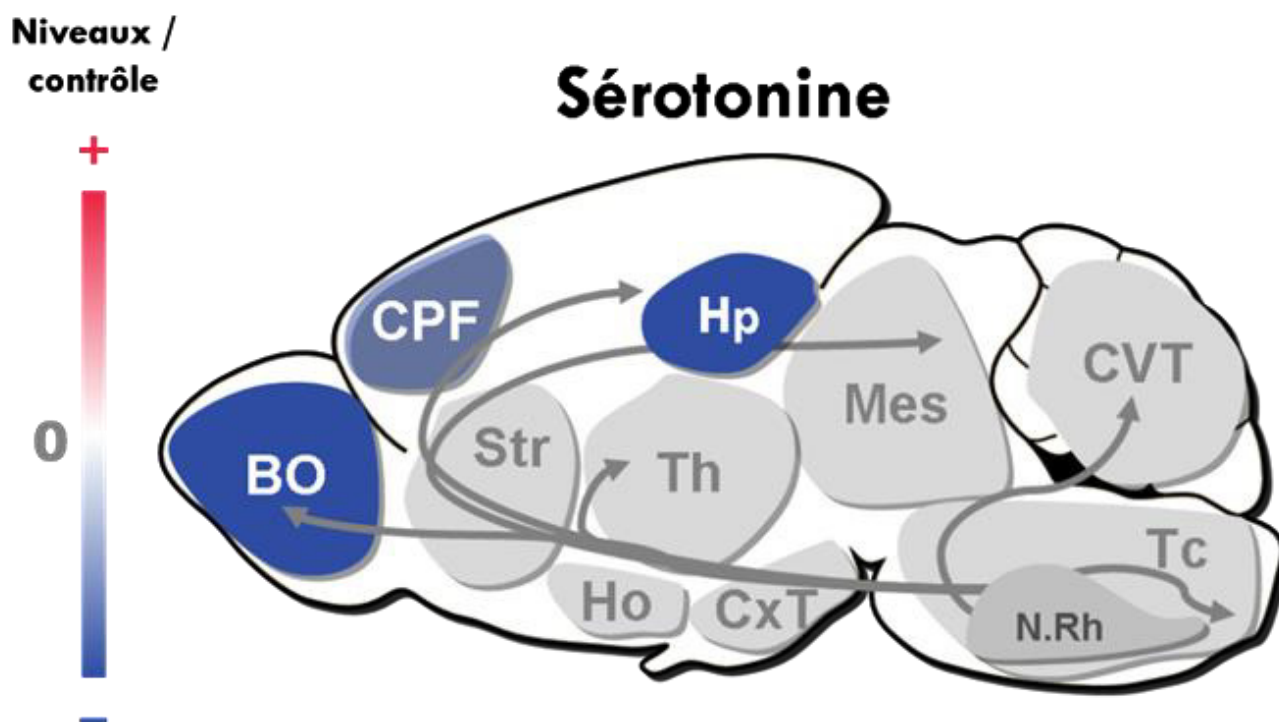


Figure D3 : Représentation schématique globale des altérations sérotoninergiques observées chez les fœtus F1. L'échelle de couleur représente le sens et l'intensité de variation des altérations mesurées dans les différentes régions cérébrales chez les lapins exposés. **BO** : Bulbe Olfactif ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **N.Rh** : Noyaux du Raphé ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus. Image inspirée de [Dos Santos Coura & Granon, 2012](#).

sélectives des neurones dopaminergiques *via* l'activation phagocytaire de la NADPH oxydase microgliale.

D'autre part, Yokota et collaborateurs (2009, 2013) ont montré une diminution des niveaux de DA et de ses métabolites dans le CPF ainsi qu'une augmentation au niveau de l'amygdale de souris adultes exposées *in utero* aux PFD. Les auteurs ont alors corrélé ces données neurochimiques avec des travaux antérieurs (Sugamata et al., 2006a), où la présence de particules avait été mise en évidence dans le CPF et le Str. Ainsi, les particules inhalées peuvent pénétrer dans le cerveau et s'accumuler dans ces structures, menant à des lésions neuronales dopaminergiques et à une modification des niveaux de DA et de ses métabolites. Par contre, ces mêmes auteurs (Yokota et al. ; 2013) n'ont pas observé de particules dans l'amygdale et n'ont donc pas pu corrélérer les altérations monoaminergiques observées dans cette même structure, ce qui suggère que les mécanismes de toxicité dopaminergiques pourraient être la conséquence de modifications fonctionnelles survenant dans d'autres régions du cerveau sous l'effet de ces particules (effet indirect).

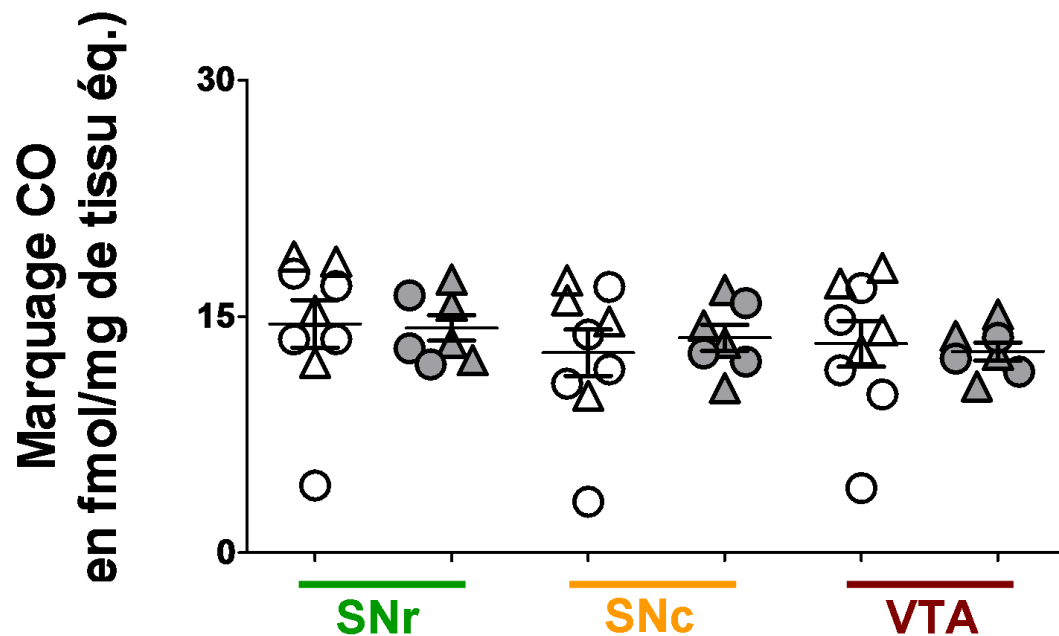
1.4.2. Les modifications de la neuromodulation dopaminergique pourraient être liées à des altérations sérotoninergique dans les mêmes structures

Alors que l'intensité de marquage de la TrpH mesurée dans les noyaux du Raphé des animaux exposés n'est pas différente de celle observée chez les animaux contrôles, des modifications antagonistes du taux tissulaire de 5-HT ont été mis en évidence dans les régions où des modifications concomitantes de la DA ont été observées, suggérant une relation intrinsèque entre les deux systèmes dans ces différentes régions (Figure D3).

Si nous sommes conscients que les modifications centrales induites par la pollution atmosphérique sont complexes et peu documentées au stade fœtal, il est intéressant de remarquer que des modifications similaires de l'activité de ces deux mêmes systèmes ont été mesurées chez des souris adultes ayant subi une exposition gestationnelle aux PFD (Yokota et al., 2016) dans des régions cérébrales qui, pour certaines, sont les mêmes que celles mesurées dans notre étude (cortex préfrontal).

En outre, il a été montré que les patients Parkinsoniens présentent des niveaux de 5-HT plus faibles au niveau du noyau caudé, du cortex cingulaire, du cortex entorhinal, du cortex frontal, de l'hippocampe et du thalamus (Huot et al, 2011; Scatton et al, 1983). De tels résultats peuvent être expliqués du fait que les systèmes dopaminergique et sérotoninergique sont interconnectés et que la 5-HT module la transmission dopaminergique et les taux de DA *via* les récepteurs sérotoninergiques présents sur les neurones dopaminergiques (Alex et Pehek, 2007; Lucas et al, 2000).

D'autre part, Yokota et collaborateurs (2016) ont montré que l'exposition aux PFD *in utero* entraînait l'apparition de comportements agressifs plus importants et plus prononcés chez les souris mâles issus de mères exposées par rapport aux contrôles,



○ Mâles contrôles (N=5) ● Mâles exposés (N=3)
 △ Femelles contrôles (N=4) ▲ Femelles exposées (N=4)

Figure D4 : Effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur l'activité CO au niveau de la substance noire (SN) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) chez des fœtus F1. Représentation graphique du niveau d'activité Cytochrome oxydase (CO) chez les fœtus issus de femelles contrôles (N=5 mâles ; N=4 femelles ; en blanc) ou de femelles exposées (N=3 mâles ; N=4 femelles ; en gris). Les résultats sont exprimés sous forme de nuage de points avec une représentation de la moyenne $\pm$ ESM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. **SNr** : Substance noire *pars reticulata* ; **SNc** : Substance noire *pars compacta* ; **VTA** : Aire tegmentale ventrale.

suggérant un lien possible entre ce phénotype comportemental et les dérégulations sérotoninergiques observées chez les mêmes animaux (Yokota et al, 2016). Effectivement, la 5-HT est présente dans tout le SNC et joue un rôle clé dans la régulation des comportements sociaux et non-sociaux (Centenaro et al, 2008 ; Fox et al, 2009) en modulant l'activité d'autres neurotransmetteurs, tels que la DA, le glutamate et le GABA (Di Matteo et al, 2008 ; Doty et al, 2012a).

Une hypothèse possible pouvant expliquer ces dérégulations monoaminergiques, et déjà évoquée en se basant sur l'étude menée par Mundiñano et collaborateurs sur le système olfactif (2011), est que l'augmentation des niveaux de DA au niveau du SNC induite par l'exposition aux PFD pourrait être une réponse plastique compensatoire suite à une dénervation sérotoninergique, avec pour conséquence l'apparition de dysfonctionnements neurocomportementaux apparaissant tardivement dans la vie de l'individu. Cependant, nos données au niveau du SNC restent parcellaires et nécessitent une investigation plus approfondie, en particulier pour confirmer ce possible « lien » fonctionnel entre les systèmes sérotoninergique et dopaminergique, ainsi que les répercussions neurodéveloppementales qui en découleraient. En effet, nous avons observé une diminution de marquage de la TH au niveau du Str, ce qui suggère une possible modulation de la transmission dopaminergique dans cette région, telle qu'elle peut être observée dans plusieurs atteintes neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson. Cependant, étant donné que l'investigation du système sérotoninergique *via* l'immunomarquage de la TrpH n'a pas été concluante, la pertinence de l'implication de ce système reste posée.

Afin de pouvoir caractériser de possibles atteintes anatomo-fonctionnelles localisées dans le cerveau, les effets de l'exposition aux PFD sur l'activité régionale de la cytochrome oxydase ont été étudiées comme cela a déjà été fait dans le cadre de l'étude de la neurotoxicité développementale d'autres polluants tels que les HAP (Crépeaux et al, 2012, 2013). En effet, étant donné que la CO est considérée comme un indice de l'activité neuronale du fait du rôle de cette enzyme dans l'allocation énergétique aux besoins de la cellule, cette analyse peut permettre de : 1) souligner un éventuel phénomène compensatoire des circuits neuronaux suite à l'exposition, s'expliquant au travers de modifications des niveaux d'activité des cellules neuronales, et 2) identifier des régions cérébrales d'intérêt présentant une sensibilité accrue aux effets de cette exposition par rapport à d'autres territoires cérébraux moins sensibles.

Cependant, le marquage de l'activité de cette enzyme s'est avéré faible et non différencié entre les différentes régions du cerveau, probablement du fait de la faible demande énergétique au niveau neuronal en absence de stimulation centrale spécifique lors de la vie fœtale.

S'il n'a pas été possible de différencier des niveaux d'activité entre diverses régions mesurées à ce stade comme la SN et la VTA (Figure D4), il faut tout de même noter

qu'aucune différence du niveau d'activité de la CO mesuré globalement au niveau du cerveau n'a été mesurée entre les deux groupes. Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence étant donné le niveau faible de l'activité à ce stade de développement.

Au final, l'ensemble des résultats étudiés ici démontre qu'une exposition gestationnelle aux PFD peut produire des changements dans la mise en place et le maintien des circuits neuronaux centraux et périphériques.

Étant donné que les perturbations du développement cérébral peuvent se manifester plus tard dans la vie sous forme de troubles neurologiques, comportementaux, émotionnels ou cognitifs ([Dubovický et al., 2008](#)), les effets à court terme de l'exposition des PDF sur le cerveau du fœtus pourraient avoir des conséquences à plus long terme sur la fonctionnalité cérébrale de l'individu. Ainsi, la question qui se pose maintenant est de savoir si les altérations anatomo-fonctionnelles observées au stade fœtal persistent à l'âge adulte et, si oui, à quels types d'altérations olfactives et centrales elles peuvent mener.

2. L'exposition gestationnelle répétée aux PFD affecte le développement neurodéveloppemental de la descendance

2.1. Les animaux exposés in utero aux PFD pourraient avoir des déficits d'identification à l'âge adulte

Les résultats obtenus dans le test de discrimination olfactive suggèrent que les animaux mâles exposés discriminent à l'âge adulte sans difficulté l'odeur alimentaire, bien que l'interprétation des données comportementales reste difficile du fait d'incohérences entre la préférence de place, le nombre de contacts et le temps de reniflage pour les animaux exposés.

En effet, contrairement aux témoins, ces animaux ne manifestent pas de préférence de place et ne présentent pas un nombre de contact différent entre la boule vide et la boule pleine de foin, ce qui suggère une absence de discrimination ou une absence d'intérêt pour le foin. En revanche, le temps de reniflage de la boule pleine est plus élevé que celui de la boule vide, et ceci aussi bien à PND118 que PND190, ce qui indique que les animaux exposés discriminent les deux boules à thé.

Si ces résultats laissent à penser que les animaux exposés discriminent correctement la boule remplie de foin de celle vide, le temps de reniflage plus long du foin pourrait indiquer une difficulté des animaux à l'identifier correctement, les obligeant à renifler de manière plus appuyée la boule pour intégrer les différentes dimensions du signal odorant généré par le foin. Dans ce cas, ce résultat pourrait être indicateur d'un problème de performance olfactive persistant à l'âge adulte chez les lapins précocement exposés aux PFD. Cependant, les faibles scores réalisés par les animaux et les différences individuelles fortes, y compris après un jeûne sensé les motiver, rend difficile l'interprétation du test.

Chez l'homme, Calderón-Garcidueñas et collaborateurs ([Calderón-Garcidueñas et al, 2010](#)) ont montré que les enfants et jeunes adultes résidant dans des zones fortement polluées du Mexique présentaient une diminution significative des scores au test d'identification des odeurs de l'Université de Pennsylvanie (UPSIT) par rapport aux individus résidant dans des zones moins polluées. Ils ont suggéré que ces personnes couraient un risque élevé de développer ultérieurement des déficits olfactifs et cognitifs. De plus, diverses études expérimentales ont mis en évidence une dérégulation des systèmes neuromodulateurs innervant les tissus olfactifs suite à des expositions ([Doty et al, 2012a, 2012b](#) ; [Mundiñano et al, 2011](#) ; [Yokota et al, 2009, 2013, 2016](#)), altérations qui semblaient mener à l'apparition de dysfonctionnements olfactifs, tels que des déficiences d'identification, discrimination ou mémoire des odeurs ([Doty et al, 2012a](#)). Ici, seule une odeur complexe a été utilisée, ce qui ne permet pas de juger de ces différentes composantes olfactives. De plus, seuls les individus mâles ayant été analysés à ce stade, une corrélation entre les atteintes olfactives à la naissance et à l'âge adulte n'est pas possible.

2.2. Les effets de l'exposition gestationnelle aux PFD sur la neuromodulation monoaminergique du système olfactif persistent à l'âge adulte

Les résultats neurochimiques et immunohistochimiques obtenus à l'âge adulte montrent que les altérations des systèmes monoaminergiques bulbaires observées à la fin de la gestation persistent, mais avec un profil neurochimique différent de celui observé au stade fœtal. En effet, il a été observé ici une augmentation significative du niveau de dopamine et de ses deux métabolites principaux (DOPAC et HVA), ainsi qu'une altération sexe-dépendante des afférences dopaminergiques et de l'activité AChE au niveau du BO. Les systèmes sérotoninergiques et noradrénergique, quant à eux, ne présentent pas d'altérations majeures chez les animaux adultes, contrairement à ce qui avait été observé au stade fœtal.

Ces résultats suggèrent donc que l'exposition aux PFD perturbe l'intégrité neurochimique bulbaire à long terme, ce qui est à mettre en relation avec les possibles modifications de la performance olfactive observées par ailleurs. L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse de modulation anatomo-fonctionnelle bulbaire à long terme sous l'effet de l'exposition aux PFD, dans le sens d'une réponse adaptatrice dopaminergique (tel que évoqué plus haut). Il aurait été intéressant de compléter ces données en mettant en évidence des altérations du nombre et/ou de l'activité de cellules dopaminergiques bulbaire afin de comprendre les causes des altérations neurochimiques.

Peu d'études se sont intéressées à la caractérisation des effets à court et à long terme d'une exposition gestationnelle aux polluants atmosphériques, et particulièrement aux PFD, sur le bulbe olfactif et sont assez contradictoires. Les travaux d'Allen et collaborateurs (2014a), suite à une exposition postnatale précoce aux particules ultrafines, n'ont pas mis en évidence des dérégulations des voies monoaminergiques au niveau bulbaire chez les animaux à PND14 ou PND55. En revanche, suite à une deuxième exposition (à PND57-PND59), des altérations monoaminergiques dans le BO chez les animaux réexposés ont été observées, suggérant un lien possible entre les fenêtres d'exposition et les fenêtres d'observation, où les dérégulations monoaminergiques ont été mises en évidence. De plus, des dérégulations monoaminergiques ont également été observées chez ces animaux dans le cortex frontal, l'hippocampe et le tronc cérébral (Allen et al., 2014a, 2014b).

Une augmentation du niveau de DA a été observée chez dans le cortex préfrontal et le striatum des souris adultes exposées *in utero* à des nanoparticules de TiO₂, mais aucune dérégulation monoaminergique bulbaire n'a été observée (Takahashi et al., 2010). Ainsi, une comparaison et discussion des persistance des effets des PFD sur la voie dopaminergique reste difficile, car peu documentée. De plus, rien ne permet de savoir si les structures olfactives sont encore directement impactées par les particules à l'âge adulte, ce qui pourrait continuer à participer à l'évolution des modulations, malgré l'interruption de l'exposition. En effet, nous n'avons pas recherché la présence résiduelle

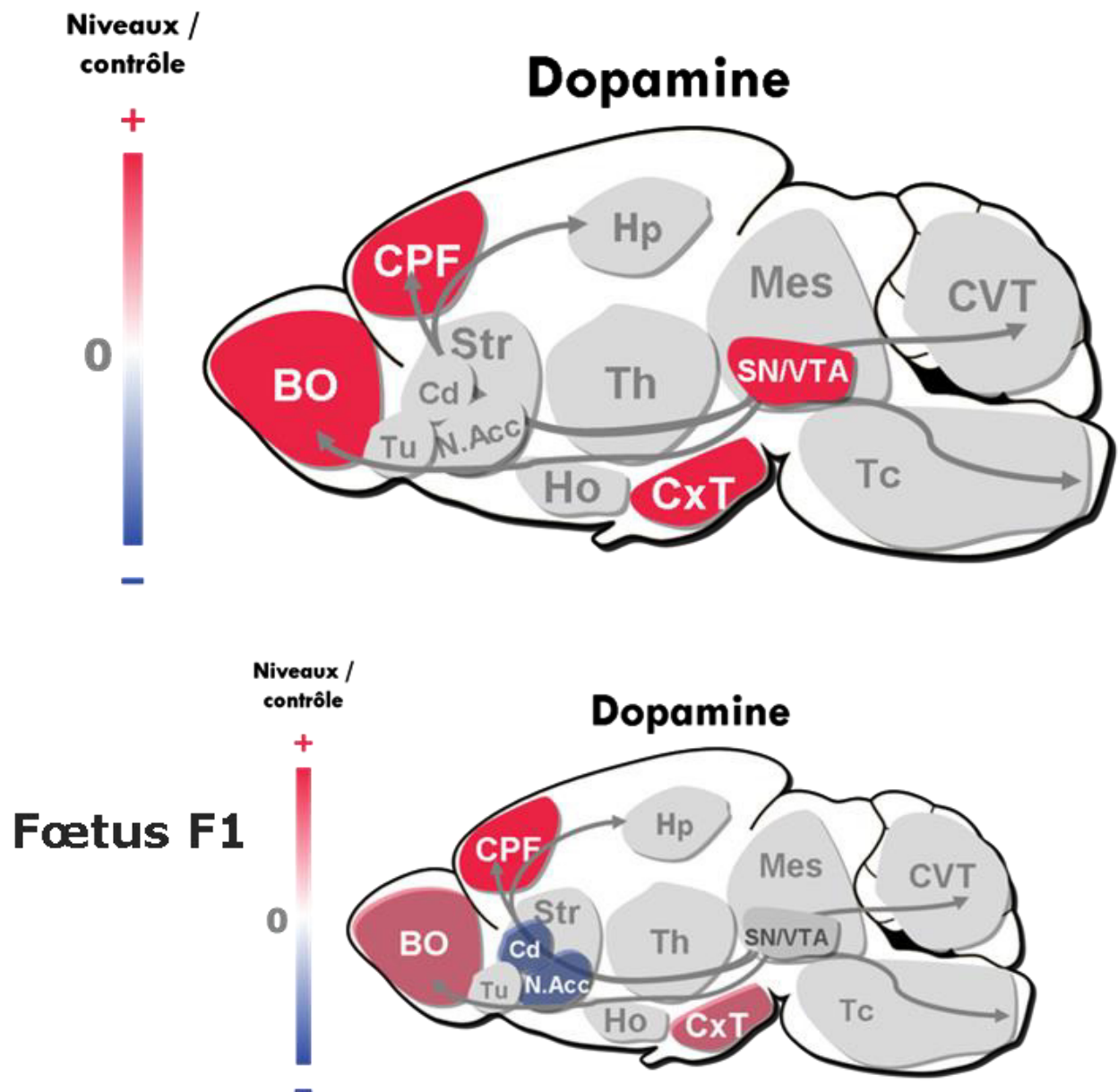


Figure D5 : Représentation schématique globale des altérations dopaminergiques observées chez les adultes F1. L'échelle de couleur représente le sens et l'intensité de variation des altérations mesurées dans les différentes régions cérébrales chez les lapins exposés. **En bas**, à titre de rappel, le schéma global des altérations dopaminergiques observées chez les foetus F1. **N.Acc** : Noyau Accumbens ; **BO** : Bulbe Olfactif ; **Cd** : Caudé ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **SN/VTA** : Substance noire/ Aire tegmentale Ventrale ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus ; **Tu** : Tubercule olfactif. Image inspirée de [Dos Santos Coura & Granon, 2012](#).

de particules ou de leurs dérivés dans le système olfactif et le cerveau des adultes, même si nous faisons plutôt l'hypothèse que ces particules sont éliminées à ce stade dans les structures olfactives, au vu de la dynamique de renouvellement liée à la neurogenèse dans le BO et aux cellules progénitrices dans la MO (Crews & Hunter, 1994). Cette dynamique particulière permettrait le rétablissement des propriétés anatomo-fonctionnelles des circuits neurosensoriels du système olfactif, suite à l'arrêt de la perturbation environnementale.

2.3. Les animaux ayant subi une exposition gestationnelle répétée aux PFD *in utero* présentent une persistance des dérégulations de la neuromodulation centrale

2.3.1. L'exposition gestationnelle répétée aux PFD altère la neuromodulation dopaminergique des adultes exposés

L'analyse de la voie dopaminergique via le marquage TH⁺ (complété par une étude histochimique des activités AChE et CO) a permis de montrer une régulation à la hausse de la neurotransmission dopaminergique dans l'aire tegmentale ventrale (VTA). De plus, dans le CPF et le CxT, les niveaux de DA s'avèrent augmentés et s'accompagnent à la baisse des différents rapports des concentrations des métabolites DOPAC et HVA relativement à celui de la DA. Il est intéressant de remarquer la diminution significative des valeurs des différents rapports dans l'hippocampe, sans que le taux de dopamine ne soit augmenté, suggérant une diminution du tonus dopaminergique dans cette région.

Ces résultats suggèrent que l'exposition gestationnelle aux PFD mènerait à des altérations dopaminergiques dans des régions qui comprennent principalement la voie mésocorticolimbique, et qui sont impliquées dans les processus cognitifs et attentionnels (aucune altération majeure de la voie nigrostriée n'a été observée) (Figure D5).

Il est intéressant de noter que les diverses études sur l'exposition *in utero* aux PFD (Allen et al., 2014a, 2014b ; Suzuki et al., 2010 ; Takahashi et al., 2010 ; Yokota et al., 2009, 2013, 2016) ont montré qu'une telle exposition semble impacter particulièrement la voie dopaminergique, ce qui est en accord avec des travaux effectués sur les effets d'un stress prénatal sur ce système de neurotransmission, et suggère donc que le développement de la voie dopaminergique est sensible aux perturbations dues à l'exposition à des facteurs de stress précoces (Antonelli et al., 2017). Une deuxième remarque intéressante est que les dérégulations dopaminergiques observées par Allen et collaborateurs se référaient à une augmentation du niveau de DA ou à des altérations de la neurochimie cérébrale correspondant à un déséquilibre marqué entre le glutamate et la dopamine, en particulier dans le cortex frontal, région essentielle à la médiation des fonctions cognitives (Allen et al., 2014a, 2014b). Les travaux de Suzuki et collaborateurs (2010) ont également observé une augmentation du niveau de DA et de ses métabolites dans le cortex préfrontal (CPF) chez les animaux exposés *in utero* aux PFD, par rapport

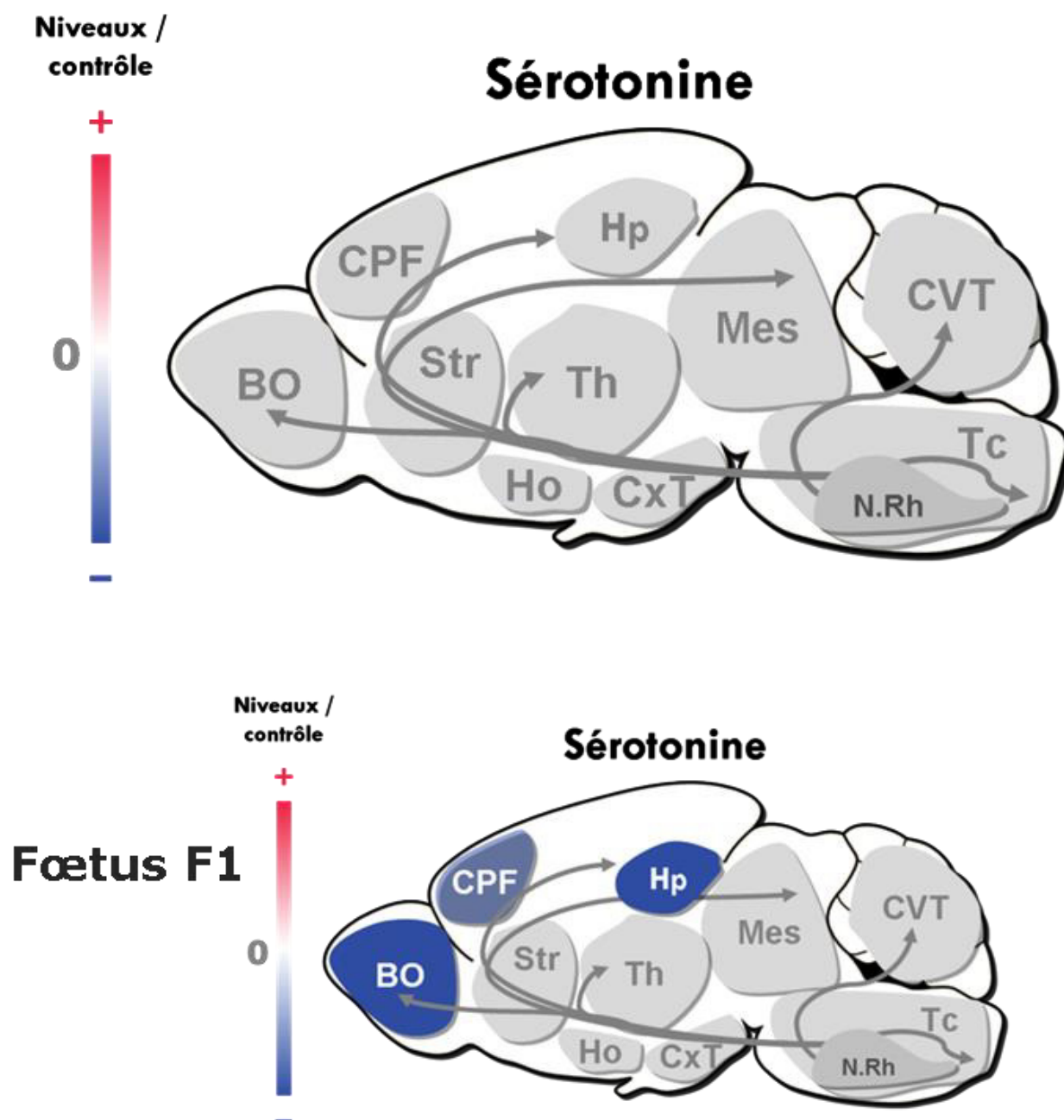


Figure D6 : Représentation schématique globale des altérations sérotoninergiques observées chez les adultes F1. L'échelle de couleur représente le sens et l'intensité de variation des altérations mesurées dans les différentes régions cérébrales chez les lapins exposés. **En bas**, à titre de rappel, le schéma global des altérations dopaminergiques observées chez les foetus F1. **BO** : Bulbe Olfactif ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **N.Rh** : Noyaux du Raphé ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus. Image inspirée de [Dos Santos Coura & Granon, 2012](#).

au groupe témoin ; de plus, le turnover du DA, indice de l'activité neuronale dopaminergique, a diminué dans diverses régions du système nerveux central, y compris le striatum, chez les animaux exposés. En outre, les travaux de Yokota et collaborateurs (2009) avaient mis en évidence une diminution des concentrations de HVA et du turnover du DA dans le striatum et le noyau accumbens des souris exposées *in utero* aux PFD.

L'ensemble des résultats évoqués ici réfère à une dérégulation de la neuromodulation dopaminergique centrale, qui semble particulièrement impacter la voie mésocorticolimbique.

2.3.2. Si la voie sérotoninergique ne présente pas d'altérations majeures, la voie kynurénine se voit altérée chez les adultes exposés

En ce qui concerne la voie sérotoninergique, aucun effet remarquable à long terme de l'exposition aux PFD n'a été observé au niveau central ; seule une augmentation significative du rapport 5-HT/TRP dans le CPF a été notée, variation observée également au niveau du BO, ce qui suggère une persistance des altérations sérotoninergiques observées au stade fœtal. Le système noradrénergique, quant à lui, ne présente pas d'altérations majeures chez les animaux adultes (Figure D6).

Par contre, il faut noter que le CPF, le CxT et l'Hp ont présenté des dérégulations de la voie tryptophane – kynurénine (en particulier du rapport K/TRP) (Figure D7), voie qui semble impliquée dans divers mécanismes menant à l'altération de fonctions cognitives et à l'émergence de troubles psychiatriques (Savitz et al., 2015 ; 2015 ; Meier et al., 2016 ; Zhou et al., 2018).

En effet, le TRP, acide aminé essentiel, se dégrade en plusieurs composés neuroactifs, dont la 5-HT, neurotransmetteur impliqué dans le contrôle des réponses adaptatives dans le système nerveux central et lié aux altérations de l'humeur et de la cognition, mais également dans la synthèse de la kynurénine (K). Dans des conditions normales, plus de 90% du TRP est métabolisé en K plutôt qu'en 5-HT. Il s'avère que les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interféron gamma (IFN- γ), sont considérées comme les inducteurs critiques du tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) et de l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO), les enzymes limitant le débit de la voie KYN. (Dantzer et al., 2011). La kynurénine est ensuite métabolisée en plusieurs métabolites dont l'acide kynurénique (KA), un inhibiteur des récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui a des effets neuroprotecteurs (Schwarcz et al., 2012).

Compte tenu des preuves existantes montrant l'implication de la voie kynurénine dans l'émergence de symptômes dépressifs ou de troubles psychiatriques, et d'altérations de fonctions cognitives, nous pourrions émettre l'hypothèse que les effets observés à court et à long terme au niveau du système nerveux pourraient être (au moins en partie) liés aux dérégulations de la voie kynurénine évoquées dans cette étude.

Niveaux /
contrôle



Kynurénine

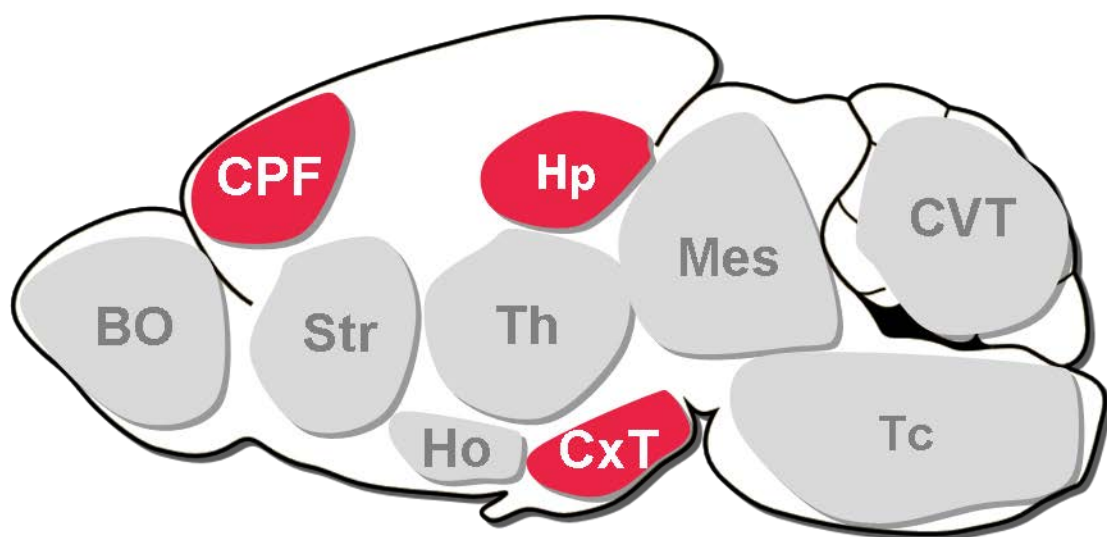


Figure D7 : Représentation schématique globale des altérations sérotoninergiques observées chez les adultes F1. L'échelle de couleur représente le sens et l'intensité de variation des altérations mesurées dans les différentes régions cérébrales chez les lapins exposés. **BO** : Bulbe Olfactif ; **CPF** : Cortex Préfrontal ; **CVT** : Cervelet ; **CxT** : Cortex Temporal/Entorhinal ; **Ho** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **Mes** : Mésencéphale ; **Str** : Striatum ; **Tc** : Tronc Cérébral ; **Th** : Thalamus. Image inspirée de [Dos Santos Coura & Granon, 2012](#).

3. L'exposition gestationnelle aux PFD semble mener à des altérations sexe-dépendantes des systèmes neuromodulateurs

L'année dernière, le NIH (National Institutes of Health) a mis en place une politique invitant les scientifiques à considérer le sexe comme une variable des systèmes qu'ils étudient. Cette décision est fondée en partie sur des données épidémiologiques et expérimentales démontrant que les deux sexes peuvent présenter des métabolismes différents (pour l'assimilation ou l'élimination d'une drogue par exemple) et/ou peuvent 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](#)). Ainsi, il a été décidé dans cette étude, de tenir compte de l'impact du sexe dans les diverses expériences effectuées.

Les analyses neurochimiques et histologiques ont révélé des altérations sexe-dépendantes au niveau de diverses structures d'intérêt, et ce au stade fœtal GD28 et au stade adulte PND216. Ces données laissent supposer que l'exposition gestationnelle aux PFD entraîne des effets sexe-dépendants, ce qui est en accord avec d'autres études ([Allen et al, 2014](#) ; [Bolton et al, 2013](#)). En particulier, Bolton et collaborateurs ([2013](#)) ont montré 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. De plus, dans l'étude d'Allen et Collaborateurs ([2014b](#)), les animaux issus de souris exposées aux PFD présentent des profils neurochimiques et comportementaux différents en fonction du sexe et du stade de développement considéré. Ces auteurs notent une augmentation de niveaux de DA au niveau du cortex préfrontal et du mésencéphale chez les souris mâles, tandis 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](#)). Ceci suggère que les altérations monoaminergiques (en l'occurrence, dopaminergiques) et les potentielles régulations qui en découlent peuvent varier en fonction du sexe de l'animal.

Bien que l'ensemble de nos résultats laisse aussi supposer que l'exposition gestationnelle aux PFD entraîne des effets neurochimiques sexe-dépendants au stade fœtal, nos résultats restent parcellaires et leur interprétation ne nous permet pas de conclure sur des effets plus marqués 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.

4. Pertinence et limitations de l'étude

4.1. Le lapin reste un bon modèle de placentation humaine en toxicologie

Comme indiqué dans la section méthodologique, le lapin a été choisi pour la structure hémodichoriale de son placenta, plus proche de celle de la femme que de celle des rongeurs, ainsi que pour sa période intergénérationnelle courte, la taille des embryons et enfin pour les outils de transcriptomique disponibles.

En revanche, le choix de cette espèce peut présenter plusieurs inconvénients, en particulier pour l'étude du cerveau :

Pour commencer, chez la lapine, la taille de la portée est de 7 à 12 lapereaux (contrairement aux grossesses uniques ou gémellaires chez la femme) ; l'environnement et les ressources sont partagés entre les différents fœtus, partage qui s'avère dépendant de leur position dans la corne utérine, et qui peut donc avoir un effet sur le développement de ce dernier ([Chavatte-Palmer et al. 2008](#)). Ces observations mettent en évidence l'importance de prendre en compte 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.

L'autre inconvénient de ce modèle animal est la longueur de sa gestation, qui est seulement de 31 jours comparés aux 9 mois dans l'espèce humaine. Ainsi, il est probable que les mécanismes d'adaptation des circuits neuronaux en réponse à une exposition gestationnelle répétée suivent une cinétique différente et utilise des mécanismes différents.

De plus, le génome reste mal annoté pour des approches moléculaires, en particulier pour démarrer les études protéomiques.

Enfin, étant donné que la plupart des anticorps commerciaux sont produits chez le lapin, il est difficile d'utiliser les approches immunohistologiques pour analyser les voies de signalisation potentiellement affectées par l'exposition gestationnelle aux particules dans cette espèce du fait des réactions croisées et générant un important bruit de fond. De plus, les approches transcriptomiques, qui permettent de s'affranchir des questions d'espèce, restent difficiles et nécessitent une validation *a posteriori* par RT-qPCR, sans oublier que les variations opérées au niveau des transcrits des gènes peuvent être faibles dans des situations d'atteinte chronique.

Enfin, du fait des conditions pratiques dans lesquelles ce modèle a été développé pour le projet BRAINAIRPOLL, nos résultats présentent une certaine fragilité au regard du nombre d'échantillons qu'il a été parfois possible d'analyser. En particulier, les conclusions tirées des expériences de microscopie électronique et d'analyse TUNEL du bulbe olfactif au stade fœtal, ainsi que les études immunohistochimiques de certaines régions centrales au stade adulte mériteraient d'être renforcées par un complément d'effectif.

4.2. Les effets neurodéveloppementaux observés ne semblent pas être dus aux conditions d'exposition

La période prénatale est cruciale pour le neurodéveloppement cérébral du fœtus ; bien qu'il n'existe pas de circuit neural direct entre la mère et le fœtus, la croissance fœtale est en grande partie dépendante des signaux physiologiques maternels délivrés *via* le placenta (Fatima et al, 2017). Dans ce contexte, le stress maternel peut conduire à des problèmes cognitifs, comportementaux et émotionnels, comme les troubles du spectre autistique et les troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité, chez l'homme, le singe (King et Laplante, 2005 ; Kinney et al., 2008 ; Grizenko et al., 2008 ; Laplante et al., 2007, 2008 ; Rodriguez et Bohlin, 2005 ; Schneider et al., 1992,1999) et les rongeurs, avec des effets sur le système DA par exemple (Antonelli et al., 2017) ou liés au sexe (Lerch, 2016).

De ce fait, se pose la question de savoir si les effets observés ici sont imputables uniquement à l'exposition aux PFD ou bien à d'autres facteurs collatéraux de l'environnement des femelles gestantes, tel que le stress induit par la mise en contention des animaux pour permettre une exposition par voie nasale. En effet, ce type d'exposition a nécessité de placer les animaux dans des tubes enserrant le corps des lapines et ne laissant émerger que leur museau dans la cellule d'inhalation. Ce maintien, similaire au stress de contention classiquement utilisé chez le rongeur, pose la question de savoir s'il existe une possible interaction entre les effets du stress induit par l'exposition et ceux du contaminant (King-Herbert et al. 1997, Tyl et al. 1994). Les travaux de Bolton et collaborateurs (2013) ont montré qu'un stress maternel survenant en fin de gestation augmente la sensibilité de la descendance aux effets de l'exposition prénatale aux PFD, ce qui suggère une « synergie » possible entre ces facteurs sur le développement cérébral, via une modification du comportement de soin maternel par exemple.

Dans notre étude, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de déterminer les conditions optimales d'exposition limitant le stress des lapines. Ces expérimentations ont permis de définir le temps optimal d'exposition (une heure, répétable deux fois par jour) et la nécessité d'habituer les lapines à entrer et rester dans les dispositifs d'exposition. Pour cela, elles ont été habituées quotidiennement dans les dispositifs pendant les 5 jours précédents la phase d'accouplement.

Cependant, seule une comparaison avec un autre lot témoin (non manipulé et non mis en contention) aurait permis de garantir une absence d'effet de la contention sur la physiologie maternelle, et donc d'exclure totalement une pré-sensibilisation maternelle aux effets de l'exposition aux PFD sur les descendants au stade fœtal.

Aucun effet significatif de la contention sur l'augmentation de température corporelle ou le taux de cortisol (considérés comme marqueurs de stress maternel), sur la biométrie des organes ou sur la biochimie sanguine des lapines gestantes n'a été observée entre les deux groupes (Valentino et al., 2016b). De plus, aucune différence

significative sur le pourcentage et la durée de gestation, sur la taille des portées et le sex-ratio n'a été relevée entre les deux groupes. Les pertes suite aux diarrhées du sevrage ont été du même ordre chez les animaux nés de mère témoin ou exposée. Ces résultats montrent ainsi que la contention imposée par le dispositif n'a pas eu d'influence majeure sur l'état physiologique général maternel, ni sur le déroulement de la gestation.

Il est intéressant de noter qu'un travail doctoral réalisé au laboratoire à Nancy s'est intéressé aux effets du stress de contention imposé par un dispositif d'exposition par voie nasale chez le rat (Peiffer, 2011). Dans cette étude, les niveaux de corticostérone plasmatique, le poids relatif du cerveau, du foie et des glandes surrénales mesurés chez les rats mis en contention et exposés à de l'air filtré ont été comparés à ceux mesurés chez des animaux exposés au fluorène sans être mis dans les tubes de contention (exposition corps entier). L'analyse des données n'a révélé aucune différence entre les deux groupes d'animaux. Cette étude a également permis de montrer qu'une habitude d'une semaine à la mise en contention permet d'avoir des niveaux de corticostérone comparables à ceux mesurés avant la première mise en contention (Peiffer, 2011). Même si l'émotivité des lapins est probablement supérieure à celle des rats, ces résultats suggèrent que l'habitude des lapines à la contention, ainsi que la limitation du temps de contention (à 2x1H par jour) permet de limiter les effets du stress liés à cette manipulation.

4.3. L'exposition « nose-only » reste un bon modèle pour la représentation des conditions d'exposition des populations humaines urbaines

La procédure expérimentale d'exposition utilisée ici peut être considérée comme un modèle représentatif des conditions d'exposition réelles des populations humaines urbaines à la pollution atmosphérique.

En effet, l'utilisation des tubes de contention dans cette étude a permis une exposition nasale stricte des animaux, permettant ainsi de contrôler le niveau d'exposition des animaux tout au long de l'étude. En effet, d'autres études utilisent des chambres d'inhalation, où les animaux sont exposés intégralement (exposition corps entier) et où les particules peuvent se déposer sur le pelage de l'animal ; elles peuvent alors être potentiellement ingérées lors du toilettage, traverser l'épithélium intestinal et atteindre les divers organes, dont le cerveau par une voie qui n'est plus l'inhalation.

D'autre part, la taille des particules présentes dans les gaz d'échappement de notre étude est proche de celle des particules émises par les véhicules diesel récents (véhicules de filtres à particules dont la porosité est de 400 nm), ce qui nous rapproche des conditions d'exposition réelles des populations humaines vivant en milieu urbain.

Il est tout de même à noter que ce modèle présente plusieurs limites :

D'une part, les lapines ont été exposées uniquement pendant la gestation alors que les femmes enceintes subissent une exposition chronique, mais ceci était un choix délibéré pour permettre d'évaluer cette unique fenêtre.

De plus, malgré une mesure de la composition du mélange inhalé, la nature chimique des particules inhalées par les lapines au cours de la gestation n'a pas pu être caractérisée, alors que cette dernière, incluant la composition de la couronne, a été démontrée comme étant 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](#) ; [Semmler-Behnke et al. 2008](#) ; [Yamashita et al. 2011](#)).

5. Conclusion générale et perspectives

La présente étude décrit les effets toxiques neurodéveloppementaux d'une exposition gestationnelle nasale quotidienne et contrôlée aux PFD, sur un modèle animal de placentation hémodichoriale humain, et dans des conditions imitant l'exposition humaine en milieu urbain. En mobilisant un grand nombre de méthodologies, depuis la microscopie électronique, l'immunohistochimie, la neurochimie, associées à des approches comportementales et neurofonctionnelles, elle apporte des éléments quant aux mécanismes responsables des effets d'éléments polluants nanoparticulaires de l'environnement sur différentes zones du cerveau. L'ensemble des résultats obtenus 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, et pourrait mener à des altérations majeures du neurodéveloppement du fœtus avec des conséquences chez l'adulte.

Ces données sont en accord avec la littérature actuelle, qui suggère que l'exposition gestationnelle à la pollution atmosphérique affecte le développement du cerveau du fœtus et pourrait, *in fine*, prédisposer l'individu à des maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives plus tard dans la vie ([Heusinkveld et al, 2016](#)). En effet, même si peu de travaux ont caractérisé le cerveau fœtal, s'intéressant plutôt aux effets à long terme après une exposition gestationnelle aux polluants atmosphériques, des données épidémiologiques récentes ont mis en évidence une participation possible de ce stade d'exposition dans l'émergence de troubles neurodéveloppementaux, tels que les troubles du spectre autistique et les troubles du déficit de l'attention et de l'hyperactivité chez l'homme ([Becerra et al, 2013](#) ; [Calderón-Garcidueñas et al, 2016](#) ; [Freire et al, 2010](#) ; [Guxens et al, 2012, 2014](#) ; [Harris et al, 2016](#) ; [Lanphear et al, 2015](#) ; [Newman et al, 2013](#) ; [Siddique et al, 2011](#)). Les données expérimentales, quant à elles, ont montré des altérations structurales et moléculaires des tissus neuronaux, pouvant conduire à des troubles neurocomportementaux chez l'adulte ([Allen et al, 2014](#) ; [Bolton et al, 2013](#) ; [Ema et al, 2013](#) ; [Hougaard et al, 2015](#) ; [Klocke et al, 2017](#) ; [Sugamata et al, 2006a, 2006b](#) ; [Wong et al, 2015](#)), ainsi qu'à des déséquilibres des systèmes monoaminergiques liés à divers troubles neurocognitifs ([Yokota et al, 2009, 2013, 2016](#)).

Témoins de la continuité anatomo-fonctionnelle entre le système olfactif et le cerveau, les résultats obtenus ont mis en évidence des désordres de la neurotransmission dans les structures antérieures cérébrales, altérations qui vont dans le sens de l'emprunt d'une voie amniotique par les particules, menant à la présence des particules dans les structures olfactives fœtales; nous proposons que la présence physique de ces particules amènerait à des dérégulations de l'homéostasie cellulaire et conduirait à une dénervation des afférences sérotoninergiques au niveau des structures cérébrales antérieures, ce qui mènerait *in fine* à une réponse plastique compensatoire dopaminergique, observée dans le bulbe olfactif. Nous n'excluons pas une participation cumulative de la voie olfactive dans les désordres observés.

Malgré les limites inhérentes au modèle et aux techniques utilisées, nos travaux ouvrent plusieurs perspectives :

Nos données ont mis en lumière différentes voies d'entrée des particules fines de diesel dans le système nerveux fœtal. Pour compléter nos résultats, il serait intéressant de déterminer selon quelle cinétique se fait la distribution des particules au niveau cérébral, sur quelles structures, et par quel mécanisme d'internalisation. Il serait également intéressant 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 maternel, sang des jeunes) pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes de transfert, distribution et « métabolisme » des PFD par le fœtus.

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, mais dont nous n'avons pas pu obtenir le maximum d'information, il faudrait disposer de nouveaux individus pour réaliser *ex 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., 2011, 2012, 2013 ; Peiffer et al., 2008 ; Peiffer, 2011) et ainsi fournir des premiers éléments de réponse quant à la sensibilité du cerveau à la présence du polluant et aux mécanismes 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 type de polluants (des gaz tels que les NOx ou l'O₃) 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. Une étude des effets de l'exposition directe du jeune, en comparaison des résultats obtenus *via* l'exposition de la mère, permettrait de déterminer le rôle de l'organisme maternel dans l'intoxication du nouveau-né.

En outre, la mise en place d'une cartographie plus complète des dérégulations des systèmes de neurotransmission cérébrale permettant de compléter celle de la cytochrome oxydase permettrait de **1)** déterminer et confirmer la sensibilité aux PFD des régions du cerveau impliquées dans la régulation de divers neuromodulateurs et des comportements auxquels ils sont associés, et **2)** confirmer l'hypothèse d'une régulation compensatoire entre les divers systèmes. Une attention particulière devrait être donnée à la voie Kynurénine, voie qui semble impliquée dans divers mécanismes menant à l'altération de fonctions cognitives et à l'émergence de troubles psychiatriques (Savitz et al., 2015 ; 2015 ; Meier et al., 2016 ; Zhou et al., 2018).

Pour terminer, une autre perspective particulièrement intéressante serait d'étudier les mécanismes épigénétiques par lesquels la transmission intergénérationnelle est possible *via* la caractérisation des profils de méthylation des tissus embryonnaires incluant le cerveau et les organes impliqués dans la gamétogenèse et la reproduction. Alors que commencent à être publiées certaines directives incluant des effets intergénérationnels liés aux environnements maternels délétères (OECD, 2001), peu d'études ont été menées sur les effets intergénérationnels de la pollution maternelle. Les résultats obtenus par Sarah Valentino sur les atteintes fœto-placentaires de la génération F2 du modèle d'étude que nous partageons confirment la nécessité d'investiguer les conséquences sur la génération suivante (Valentino et al, 2016b). En d'autres termes, est-ce que ces éventuelles modifications neurodéveloppementales peuvent aussi persister ou s'amplifier à la ***génération suivante*** ?

Au final, ces travaux offrent des pistes de compréhension de l'étiologie de certains désordres observés dans les populations humaines en lien avec l'environnement extérieur, en montrant des atteintes du fonctionnement cérébral suite à une exposition gestationnelle. 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 tant lors de ses

trajets privés et que domicile-travail doit donc être minimisé autant que possible. Des solutions de protection individuelle étant peu envisageables, la prévention reste le levier à privilégier. Nos résultats pourront donc être pris en compte dans la définition des politiques de prévention à mettre en place et comme support pour de nouvelles stratégies pour mieux protéger les personnes à risque et réduire les effets néfastes de la pollution de l'air sur le système nerveux et la santé mentale.

Annexes et liste de communications

Annexe 1 : Tableaux de synthèse des données épidémiologiques et expérimentales publiées.

Tableau 1a. Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition directe des individus à la pollution atmosphérique.

Auteur	Pays	N	Âge	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Calderón-Garcidueñas (2001).	Mexique (Mexico vs. zones rurales)	26	4-15	Neuroanatomique	MET	Exposition enfance et adolescence	PM _{2.5} (21.6 µg/m ³ vs. 15 µg/m ³) PM ₁₀ (78 µg/m ³ vs. 50 µg/m ³)	- L'épithélium nasal des résidents de Mexico est globalement désordonné ; les mécanismes de défense mucociliaire altérés
Calderón-Garcidueñas (2003).	Mexique (Mexico vs. zones rurales)	201	5-17	Neurophysiologique	Spirométrie ; radiographie thoracique ; analyses sériques	Exposition enfance et adolescence	Concentrations de PM ₁₀ d'après la station de surveillance (comparaison 68 µg/m ³ vs. 50 µg/m ³)	- Hyperinflation pulmonaire - Augmentation des niveaux sériques d'IL ₁₀ et IL ₆ - Diminution des niveaux sériques d'IL ₈ .
Calderón-Garcidueñas (2008a, 2008b, 2010, 2016).	Mexique (Mexico vs. zones rurales)	73	7-25	Neuropsychologique et Neurophysiologique	WISC-R ; IRM	Exposition enfance, adolescence et jeune adulte	Concentrations de PM ₁₀ d'après la station de surveillance (comparaison 68 µg/m ³ vs. 50 µg/m ³) Concentrations de PM _{2.5} d'après la station de surveillance (comparaison 35 µg/m ³ vs. 15 µg/m ³)	- Retards du développement cognitif (diminution de fonctions cognitives et exécutives et de mémoire) - Altérations structurelles du cerveau (lésions dans la substance blanche du cortex préfrontal) - Augmentation significative de COX ₂ , IL _{1β} et CD ₁₄ dans plusieurs tissus neuronaux - Rupture BHE et barrières épithéliales des voies respiratoires - Inflammation systémique et cérébrale - Dommages vasculaires et périvasculaires dans la matière blanche du cortex préfrontal des jeunes résidents de Mexico.

Tableau 1a (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition directe des individus à la pollution atmosphérique.

Auteur	Pays	N	Âge	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Crüts (2008)	Suède (Umeå)	10	18-39 (♂)	Neurophysiologique	QEEG	Exposition contrôlée à des gaz d'échappement de moteur diesel (Volvo TD45, 4.5 L, 4 cylindres, 680 rpm)	PM (300 µg/m³) NO ₂ (1.6 ppm) NO (4.5 ppm) CO (7.5 ppm) Hydrocarbures totaux (4.3 ppm)	- Augmentation de l'activité des ondes rapides (β2) du cortex frontal gauche pendant et après l'exposition aux DE
Chen (2009)	Etats-Unis (enquête nationale)	1764	20-59	Neuropsychologique	SDLT, SDST, SRTT	Exposition âge adulte (suivi un an avant les tests)	PM ₁₀ (35.2 µg/m³)	- Pas d'effet sur la mémoire ou l'attention
							O ₃ (24.1 ppb)	- Diminution des capacités d'attention et de mémoire
Ranft (2009)	Allemagne (Ruhr vs. zones rurales au nord de la Ruhr)	4874	68-79 (♀)	Neuropsychologique	CERAD-Plus ; test STROOP ; test olfactif (identification d'odeurs)	Exposition âge adulte (suivi 22 ans avant les tests)	Concentrations de PM ₁₀ d'après la station de surveillance à côté de l'adresse résidentielle des participantes (comparaison 48.6 µg/m³ vs. 28.3 µg/m³)	- Pas d'effet sur les fonctions cognitives et olfactives
						Exposition âge adulte (suivi 5 ans avant les tests)		- Diminution des fonctions cognitives et olfactives chez les femmes de moins de 74 ans habitant à proximité des routes fréquentées
						Exposition âge adulte (suivi 7 ans avant les tests)		
Power (2010)	Etats-Unis (Boston)	680	51-97 (♂)	Neuropsychologique	MMSE	Exposition âge adulte (suivi un an avant les tests)	BC (0.58µg/m³)	- Diminution des fonctions cognitives

Tableau 1a (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition directe des individus à la pollution atmosphérique.

Auteur	Pays	N	Âge	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Kioumourtzoglou (2016)	Etats-Unis (50 villes de la Côte nord-est)	9,8 millions	≥ 65	Travaux d'association	Lien entre pollution de l'air et hospitalisations de patients atteints de maladies neurodégénératives	Modèle de régression spatio-temporel pour mesures de l'exposition aux PM _{2.5} sur 1 an (période 1999–2010 ; données répertoriées dans USEPA, 2015)	Concentrations de PM _{2.5} d'après la station de surveillance	Estimation d'un ratio de risque pour l'apparition de maladies neurodégénératives de type démence, Alzheimer et ou Parkinson en fonction des concentrations de PM _{2.5} .
Maher (2016)	Mexico (N=29 ; choisis au hasard parmi des cas de médecine légale) et Manchester (N=8 ; issus des archives de la banque de cerveaux de Manchester)	Echantillons de 37 cerveaux	8 à 92 ans	Recherche de nanoparticules de magnétite dans le tissu cérébral humain	Magnétométrie EDX EELS HRTEM	Exposition tout le long de la vie de la personne	Nanoparticules de Magnétite	Présence de nanoparticules de magnétite dans le cortex frontal

♀ : Femmes ; ♂ : Hommes ; ppm : Parties par million ; BC : Carbone élémentaire (Black carbon) ; CERAD-Plus : Consortium pour l'établissement d'un registre de la maladie d'Alzheimer ; CO : Monoxyde de carbone ; DE : Gaz d'échappement diesel (diesel exhaust) ; EDX : Analyse par rayons X à dispersion d'énergie ; EELS : Spectroscopie de perte d'énergie électronique ; HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; HRTEM : Microscopie électronique à transmission haute résolution ; IRM : Imagerie par résonance magnétique ; MET : Microscopie électronique à transmission ; NOx : Oxydes d'azote ; O₃ : Ozone ; PM : Matière particulaire ; QEEG : Electroencéphalogramme quantitatif ; SDLT : Test d'apprentissage de chiffres en série (serial-digit learning test) ; SDST : Test de substitution chiffre-symbole (Symbol digit substitution test) ; SO₂ : Dioxyde de soufre ; SRTT : Test de réaction simple (Simple reaction time test) ; UFPM : Matière particulaire ultrafine ; WISC-R : Test d'intelligence de Wechsler pour les enfants-version révisée.

Tableau 1b. Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition des individus à la pollution atmosphérique pendant la grossesse.

Auteur	Pays	N	Suivi	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Perera (2006, 2009, 2012)	Etats-Unis (New York vs. zones autour)	648 femmes (18 à 35 ans)	Suivi de la grossesse et de l'évolution post-natale jusqu'à 7 ans	Neuropsychologique	BSID-III ; CBCL	Monitoring personnel d'exposition 48 heures avant les tests	HAP (3.5 ng/m ³)	A 3 ans (n=183) : - Pas de problèmes psychomoteurs ou comportementaux - Diminution de l'indice de développement mental
					WPPSI-R		HAP (< 2.26 ng/m ³)	A 5 ans (n=249) : - Diminution du Quotient Intellectuel (QI) global et du QI verbal - Pas de différences sur le QI non-verbal
					CBCL		HAP (< 2.27 ng/m ³)	A 6-7 ans (n=253) : - Augmentation de l'apparition de symptômes de déficit de l'attention, de l'hyperactivité (ADHD), de l'anxiété et de dépression
Suglia (2007)	Etats-Unis (Boston vs. zones autour)	500 femmes (>18 ans)	Cohorte de naissance prospective (1986-2001)	Neuropsychologique	K-BIT ; WRAML	Modèle de régression spatio-temporel pour mesures de l'exposition au trafic sur 24 heures (données provenant de > 80 sites de la région métropolitaine de Boston)	Concentrations de BC d'après la station de surveillance à côté de l'adresse résidentielle du participant (moyenne annuelle : 0.56 µg/m ³)	A 8-11 ans (n=218) : - Association entre les niveaux d'exposition et la diminution de la fonction cognitive et les constructions de la mémoire.
Edwards (2010)	Pologne (Cracovie)	5058 femmes (>18 ans)	Suivi de la grossesse (20 ^e – 30 ^e semaine de grossesse)	Neuropsychologique	RCPM	Monitoring personnel sur une période de 48 heures au cours du deuxième (n = 253) ou du troisième (n = 100) trimestre de grossesse.	HAP (<17.96 ng/m ³)	A 5 ans (n=214) : - Diminution du QI

Tableau 1b (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition des individus à la pollution atmosphérique pendant la grossesse.

Auteur	Pays	N	Suivi	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Freire (2010)	Espagne (Grenade)	250 femmes (Cohorte INMA 2000-2002)	Suivi des enfants (♂) âgés de 4 ans, pendant 1 an	Neuropsychologique	MSCA	Modèle de régression de l'utilisation des sols	NO ₂ (comparaison >24.75 µg/m ³ vs. 5-36 µg/m ³)	A 4 ans (n=210) : - Pas d'associations statistiquement significatives entre l'exposition et les capacités cognitives, bien que des diminutions sur le score cognitif global et la mémoire aient été observés. - Association entre exposition et déclin de la motricité globale.
Siddique (2011)	Inde (régions à proximité de Delhi vs. zones rurales d'Uttaranchal et de Bengale)	969 enfants résidents de Delhi 850 enfants résidents d'Uttaranchal et Bengale	Suivi des enfants ayant 9 - 17 ans (2003 - 2005)	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et l'ADHD chez l'enfant	DSM-IV	Collecte des données d'exposition aux SOx et au PM ₁₀ des stations nationales de contrôle de la qualité de l'air à proximité de la résidence (2003 - 2005)	PM ₁₀ (comparaison 161.3 µg/m ³ vs. 74.6 µg/m ³) NO ₂ (comparaison 50.1 µg/m ³ vs. 30.3 µg/m ³) SO ₂ (comparaison 9.6 µg/m ³ vs. 5.6 µg/m ³)	- Associations entre exposition élevée au PM ₁₀ chez les enfants et l'apparition de symptômes de déficit de l'attention et de l'hyperactivité (ADHD) - Prévalence des symptômes d'ADHD chez les garçons (toutes régions confondues)
Clark (2012)	Royaume-Uni (écoles à proximité de l'aéroport de Londres, Heathrow)	719 étudiants (Projet RANCH 2001-2003)	Enfants âgés de 9 à 11 ans issus de 22 écoles dans la grande région de Londres	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et le comportement chez l'enfant	SRS ; CMS ; SDQ ; Grille d'autoévaluation de santé (remplie par les parents)	Concentrations NO ₂ calculées par approche combinée de modélisation émission-dispersion (Source : King's College London)	NO ₂ (moyenne dans les écoles : 42.73 µg/m ³)	- Pas d'associations entre exposition, cognition et santé.

Tableau 1b (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition des individus à la pollution atmosphérique pendant la grossesse.

Auteur	Pays	N	Suivi	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Becerra (2013)	Etats-Unis (Los Angeles)	7603 enfants avec des troubles du spectre autistique 10 enfants sans présenter de tels troubles	Enfants diagnostiqués avec des troubles autistiques (1995-2006)	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et l'apparition de troubles du spectre autistique	DSM-IV-R	Expositions estimées en fonction des données des stations de surveillance de l'air de Los Angeles à proximité des lieux de résidence	NO (9.40 ppb) NO ₂ (5.41 ppb) PM _{2.5} (4.98 µg/m ³) O ₃ (11.54 ppb)	A 3-5 ans : - Association entre l'exposition au NO, NO ₂ , PM ₁₀ et PM _{2.5} pendant la gestation et la probabilité d'apparition de troubles du spectre autistique
Jung (2013)	Chine (Taiwan)	49 073 enfants âgés de moins de 3 ans (issus de NHIRD2000)	Suivi pendant 10 ans à partir de la naissance (2000 - 2010)	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et l'apparition de troubles du spectre autistique	ICD-9_CM	Valeur moyenne d'exposition en fonction des 70 stations de surveillance de l'EPA de Taiwan et le lieu de résidence des participants	NO ₂ (de <15.80 à ≥22.77 ppb) PM ₁₀ (de <48.68 à ≥70.58 µg/m ³) O ₃ (de <96.91 à ≥112.22 ppb) SO ₂ (de <3.34 à ≥4.67 ppb) CO (de <0.41 à ≥0.65 ppm)	- Association entre l'exposition au CO, NO ₂ , O ₃ et SO ₂ pendant la gestation et le diagnostic de troubles du spectre autistique
Newman (2013)	Etats-Unis (Zone métropolitaine de Cincinnati)	576 enfants (projet CCAAPS 2001-2003)	Suivi des enfants à 1 an d'âge (résidents de la métropole de Cincinnati)	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et l'ADHD chez l'enfant	BASC-2	Modèle de régression spatio-temporel pour mesures de l'exposition à la densité du trafic à proximité de la résidence.	BC (comparaison <0.4 µg/m ³ vs. ≥40 µg/m ³)	- Associations entre exposition élevée au BC chez les enfants et l'apparition de symptômes de déficit de l'attention et de l'hyperactivité (ADHD)
Volk (2013)	Etats-Unis (Los Angeles)	279 enfants avec des troubles du spectre autistique 245 enfants sans présenter de tels troubles	Enfants diagnostiqués avec des troubles autistiques (Etude CHARGE 1994–2003)	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et l'apparition de troubles du spectre autistique	MSEL ; ADI-R ; ADOS ; VABS	Reprise des niveaux d'exposition aux PM _{2.5} , PM ₁₀ et NO ₂ , basés sur le programme régional de surveillance de la qualité de l'air de l'EPA (1997–2009)	Concentrations d'exposition non détaillées	A 2-5 ans : - Association entre l'exposition au NO, NO ₂ , PM _{2.5} et O ₃ pendant la gestation et la probabilité d'apparition de troubles du spectre autistique

Tableau 1b (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition des individus à la pollution atmosphérique pendant la grossesse.

Auteur	Pays	N	Suivi	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Kim (2014)	Corée du Sud (Seoul, Cheonan, Ulsan)	520 couples mère-enfant (mères >18 ans) Etude MOCEH	Suivi des enfants pendant 24 mois à partir du 1 ^{er} trimestre de grossesse (naissance entre 2006 et 2008).	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et le neurodéveloppement de l'enfant	K-BSID-II	Modèle de régression spatio-temporel pour mesures de l'exposition aux NO ₂ et au PM ₁₀ des 38 stations nationales de contrôle de la qualité de l'air à proximité de la résidence (2006 - 2008).	NO ₂ ([13.08 ; 45.12] ppb) PM ₁₀ ([38.84 ; 69.95] µg/m ³)	Au cours des 24 mois : - Association entre l'exposition au PM ₁₀ et au NO ₂ et la diminution de l'indice du développement mental - Association entre l'exposition au PM ₁₀ et la diminution de l'indice du développement psychomoteur.
Lin (2014)	Chine (Taiwan)	533 couples mère-enfant de 11 villes de Taiwan	Suivi des enfants pendant la grossesse et à l'âge de 0 à 6 mois, de 7 à 12 mois et de 13 à 18 mois (naissance entre 2003 et 2004).	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et le comportement chez l'enfant	BSID-II	Valeur moyenne d'exposition en fonction des stations de surveillance de la qualité de l'air exploitées par le réseau de surveillance de la qualité de l'air de Taiwan (TAQMN) situées dans 11 villes de Taiwan et le lieu de résidence des participants	NO ₂ ([12.57 ; 23.10] ppb) PM ₁₀ ([39.41 ; 72.39] µg/m ³) O ₃ ([31.51 ; 38.87] ppb) SO ₂ ([3.63 ; 6.31] ppb) CO ([0.45 ; 0.67] ppm) THC ([2.32 ; 2.70] ppm) NMTHC ([0.285 ; 0.42] ppm)	De la grossesse à 12 mois : - Association entre l'exposition au SO ₂ , le déclin du développement de la motricité fine et le neurocomportement de l'enfant. Au 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de grossesse : - Association entre l'exposition au NMTHC et le déclin du développement moteur grossier.

Tableau 1b (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition des individus à la pollution atmosphérique pendant la grossesse.

Auteur	Pays	N	Suivi	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Peterson (2015)	Etats-Unis (New York vs. zones autour)	648 femmes (18 à 35 ans)	Suivi de la grossesse et de l'évolution post-natale jusqu'à 9 ans	Neuropsychologique et neurophysiologique	CBCL; WISC-IV; IRM	Utilisation du monitoring personnel d'exposition pendant la grossesse et à 5 ans	HAP ($< 2.27 \text{ ng/m}^3$)	A 7-9 ans (n=40) : - Réductions de la surface de la substance blanche dans l'hémisphère gauche du cerveau - Diminution de la vitesse de traitement de l'information - Augmentation de l'apparition de symptômes d'ADHD
Harris (2016)	Etats-Unis (villes et banlieues orientales du Massachusetts)	1212 enfants (cohorte Projet Viva 1999-2002)	Suivi du 3 ^{ème} trimestre de grossesse à 3 et 6 ans, et l'année précédant l'évaluation comportementale	Travaux d'association entre l'exposition aux polluants atmosphériques et la fonction exécutive et le comportement chez l'enfant	BRIEF ; SDQ	Modèle de régression spatio-temporel pour mesures de l'exposition à la densité du trafic à proximité de la résidence.	BC (comparaison $>0.5 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ vs. $\leq 0.5 \text{ } \mu\text{g/m}^3$)	A 3 ans : - Pas d'associations entre exposition élevée au BC et scores BRIEF ou SDQ. A 7-8 ans : - Associations entre exposition élevée au BC chez les enfants et des scores BRIEF plus élevés (attribués par les enseignants)

Tableau 1b (suite). Études épidémiologiques portant sur l'association entre troubles cérébraux et exposition des individus à la pollution atmosphérique pendant la grossesse.

Auteur	Pays	N	Suivi	Type d'évaluation	Test	Période d'exposition	Type de polluant	Principaux constats
Guxens (2018)	Pays-Bas (Rotterdam)	783 enfants ayant 6 - 10 ans (Generation R Study)	Suivi des enfants pendant la grossesse (naissance entre 2002 - 2006)	Neuropsychologique et neurophysiologique	NEPSY-II ; IRM	Modèle de régression spatio-temporel pour mesures de l'exposition aux polluants atmosphériques à proximité des résidences des participants (données provenant de > 40 sites à travers les Pays-Bas et la Belgique)	UFPM ([16.8 ; 28.1] µg/m ³) NO ₂ (comparaison 25.3 µg/m ³ vs. 73.3 µg/m ³)	- Associations entre exposition aux UFPM et la diminution de la surface du cortex dans plusieurs régions du cerveau. - Associations entre exposition aux UFPM et le déclin de fonctions exécutives,

♀ : Femmes ; ♂ : Hommes ; **ppb** : Parties par milliard ; **ppm** : Parties par million ; **ADI-R** : Entretien de diagnostic de l'autisme ; **ADOS** : Echelle de diagnostic de l'autisme ; **ADHD** : déficit de l'attention, de l'hyperactivité ; **BASC-2** : 2^{ème} édition du système d'évaluation du comportement des enfants ; **BC** : Carbone élémentaire (Black carbon) ; **BSID** : Tests de Bayley pour l'évaluation du neurodéveloppement de l'enfant ; **BRIEF** : Évaluation du comportement de la fonction exécutive ; **CBCL** : Test du comportement de l'enfant ; **CO** : Monoxyde de carbone ; **DE** : Gaz d'échappement diesel (diesel exhaust) ; **CMS** : Test d'échelle de mémoire infantile ; **DSM-IV** : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux – 4^{ème} édition ; **DSM-IV-TR** : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux – 4^{ème} édition – Texte révisé ; **HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; **ICD-9_CM** : Classification internationale des maladies, 9e révision, modification clinique ; **IRM** : Imagerie par résonance magnétique ; **K-BIT** : Test d'intelligence de Kaufman ; **K-BSID-II** : Tests de Bayley pour l'évaluation du neurodéveloppement de l'enfant - version coréenne ; **NHIRD2000** : base de données de la National Insurance Research de Taiwan de l'année 2000 ; **MSEL** : Test d'apprentissage précoce de Mullen ; **MSCA** : Test des capacités de l'enfant de McCarthy ; **NEPSY-II** : Bilan neuropsychologique de l'enfant—Seconde édition ; **NOx** : Oxydes d'azote ; **O₃** : Ozone ; **PM** : Matière particulaire ; **RCPM** : Matrices progressives de Raven ; **SDQ** : Questionnaire sur les forces et les difficultés ; **NMTHC** : Hydrocarbures non méthaniques ; **SRS** : Test de lecture de Suffolk ; **TAQMN** : Réseau de surveillance de la qualité de l'air de Taiwan ; **THC** : Hydrocarbures totaux ; **UFPM** : Matière particulaire ultrafine ; **VABS** : Test de comportement adaptatif de Vineland ; **WISC-IV** : Test d'intelligence de Wechsler pour les enfants- 4^{ème} édition ; **WPPSI-R** : Test d'intelligence de Wechsler pour les enfants en préscolaire et primaire-version révisée ; **WRAML** : Test d'évaluation de la mémoire à court et à long terme et la cognition.

Tableau 2a. Effets d'une exposition répétée contrôlée directe aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP).

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Calderón-Garcidueñas (2002, 2003, 2008a, 2016)	40 Chiens de rue (15♂/25♀) âgés de 7 à 10 ans (n=14 animaux contrôle ; n=26 animaux exposés)	<u>D'après la station de surveillance</u> Concentrations de PM ₁₀ (comparaison 68 µg/m ³ vs. 50 µg/m ³) Concentrations de PM _{2.5} (comparaison 35 µg/m ³ vs. 15 µg/m ³)	Exposition dans la rue (Mexico vs. zones rurales)	Exposition tout le long de la vie de l'animal	- Désorganisation structurale de la MO (isolement des glandes de Bowman, augmentation des cellules progénitrices,...) et le cerveau (dérégulation astrocytaires dans l'hippocampe et le cortex temporal) - Augmentation significative de COX₂, iNOS, APP et MT I-II dans plusieurs tissus neuronaux - Présentation de plaques β-amyloïdes au niveau des cortex frontal et entorhinal et dans les vaisseaux sanguins sous-arachnoïdien
Campbell (2005)	Souris ♂ âgés de 6 semaines (lignée BALB/c) (n=8/groupe)	PM (concentration moyenne: 441.7 µg/m ³ ; diamètre <2.5 µm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	4 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 2 semaines	- Augmentation significative de TNFα, IL_{1α} et NFκB dans plusieurs tissus neuronaux
Veronesi (2005)	Souris adultes ApoE ^{-/-} (lignée C57BL/6J) (n=6-9/groupe)	CAPS (de Tuxedo, NY) (concentration moyenne: 110 µg/m ³ ; diamètre <2.5 µm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	6 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 5-6 mois	- Diminution du marquage TH⁺ au niveau de la SNc des animaux ApoE^{-/-} - CAP par rapport aux animaux ApoE^{-/-} - air. - Augmentation du marquage GFAP⁺ au niveau de la SNc des animaux ApoE^{-/-} - CAP par rapport aux animaux ApoE^{-/-} - air.
Win-Shwe (2008)	Souris ♂ adulte (lignée BALB/c) (n=6/groupe)	NRDE (148.86 µg/m ³ ; diamètre= 26.21 nm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	5 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines	<u>Poids corporel :</u> - Pas de différences significatives entre les groupes d'animaux <u>Piscine de Morris :</u> - Augmentation de la latence pour rejoindre la plate-forme pendant les 2 premiers jours de la phase d'acquisition <u>Expression des gènes (ARNm) dans l'hippocampe des animaux exposés :</u> - Augmentation du niveau d'ARN de NR1 et TNF-α - Pas d'effets sur l'expression de NR2A, NR2B, IL-1β et HO-1
Hougaard (2009)	Souris ♀ adulte (lignée C57BL/6) (n=10/groupe)	DEP (SRM 2975, 71.5 mg/m ³ ; diamètre <1µm)	Chambre d'inhalation (exposition de la tête seulement)	4 jours consécutifs, 90 min/jour	- Diminution de l'activité locomotrice chez les ♀ exposées par rapport aux ♀ contrôles

Tableau 2a (suite). Effets d'une exposition répétée contrôlée directe aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP).

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Gerlofs-Nijland (2010)	Rats ♂ âgés de 15-16 semaines (lignée Fischer F344/DUCRL) (n=15/groupe)	Exposition contrôlée à des gaz d'échappement de moteur diesel (35 KVA Genset, 1500 rpm) <u>DE</u> PM (diameter: 76 ± 5 nm; concentration: 173 µg/m ³); COV (529 µg/m ³); NO ₂ (1.3 ppm); NO (0.08 ppm); NOx (0.5 ppm); CO ₂ (9718 ppm); CO (2.6 ppm)] <u>Air filtré</u> Air conditionné, purifié et filtré (filtre HEPA)	<u>Exposition à l'ozone</u> (chambre d'inhalation 12H avant les expositions au DE) Puis Exposition au DE (exposition « nose-only »)	6 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines	- Diminution du niveau de TNFα dans le BO+T - Augmentation des niveaux de TNFα et d'IL1α dans le Str - Aucune différence sur les niveaux des facteurs de transcription NF-κB et AP-1, ni sur les taux d'ARNm de TNFα et de TNF-R1
Fonken (2011)	Souris ♂ âgés de 6 semaines (lignée C57BL/6J) (n=6-9/groupe)	PM _{2.5} (concentration moyenne totale : 16.85 µg/m ³)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	6 h/jour, 5 jours par semaine, Avril 2009 à janvier 2010	<u>Labyrinthe de Barnes :</u> - <i>Phase d'entraînement</i> ▪ Latence plus importante pour atteindre le trou cible ▪ Nombre d'erreurs plus important avant d'atteindre le trou cible - <i>Phase de rétention</i> ▪ Augmentation de la latence de première visite du trou cible ▪ Diminution du pourcentage de visites dans la zone du trou cible
Yokota (2011)	Rats ♂ à PN14 (lignée Sprague-Dawley) (n=10/groupe)	NRDEP véhicule, 10 µg de NRDEP ou 50 µg de NRDEP	Instillation intranasale	1 fois par semaine, pendant 4 semaines	<u>Locomotion (à 6 semaines : période de 24H) :</u> - Augmentation de l'activité motrice spontanée chez les animaux 10 µg de NRDEP au cours des premières heures de la période de lumière (13h00 à 16h00) - Tendance à une diminution de l'activité motrice spontanée chez les animaux 50 µg de NRDEP au cours du test) <u>Test d'évitement (à 9 semaines) :</u> - Les performances d'évitement sont inférieures chez les animaux NRDEP (10 µg et 50 µg) par rapport à celles des animaux témoins, dans les conditions d'une installation à l'air

Tableau 2a (suite). Effets d'une exposition répétée contrôlée directe aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP).

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Yokota (2011) suite	Rats ♂ à PN14 (lignée Sprague-Dawley) (n=10/groupe)	NRDEP véhicule, 10 µg de NRDEP ou 50 µg de NRDEP	Instillation intranasale	1 fois par semaine, pendant 4 semaines	<u>Histopathologie (à 5 semaines) :</u> - Présence d'un nombre important de corps lamellaires dense aux électrons dans le glomérule des BO des animaux 50 µg. de NRDEP. - Accumulation de granules (diamètre moyen = 20 nm) au niveau des axones. - Aucune anomalie n'a été observée dans le cerveau et la cavité nasale des animaux traités. - Aucun dépôt dans les poumons de NRDEP n'a été observé. <u>Neurochimie (à 14 semaines) :</u> - Tendance à une diminution des niveaux de dopamine et de son métabolite (DOPAC) dans le corps mamillaire médian chez les animaux traités au NRDEP par rapport aux animaux contrôle.
Bos (2012)	Souris ♂ âgés de 6 semaines (lignée C57BL/6J) (n=7-8/groupe)	Environnement pollué issu d'un tunnel d'autoroute (Tunnel de Craeybeckx à Anvers, Belgique) PM _{2.5} (55.1 µg/m ³) BC (13.9 µg/m ³)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	5 jours d'exposition	- Augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (COX2, iNOS, eNOS et NFE2L2) dans l'hippocampe des souris exposées par rapport aux souris contrôle - Diminution de l'expression de divers gènes liés à l'inflammation (IL1α, COX2, NFE2L2, IL6 et BDNF) au niveau du BO
Win-Shwe (2012)	Souris ♂ adulte (lignée BALB/c) (n=8/groupe)	NRDE [M-NRDE (47 µg/m ³ ; diamètre= 23.19 nm) H-NRDE (129 µg/m ³ ; diamètre= 24.98 nm) F-NRDE (8.52 µg/m ³ ; pas de particules présentes]	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	5 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 3 mois	<u>Poids corporel :</u> - Pas de différences significatives entre les groupes d'animaux

Tableau 2a (suite). Effets d'une exposition répétée contrôlée directe aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP).

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Win-Shwe (2012) suite	Souris ♂ adulte (lignée BALB/c) (n=8/groupe)	NRDE [M-NRDE (47 µg/m³; diamètre= 23.19 nm) H-NRDE (129 µg/m³; diamètre= 24.98 nm) F-NRDE (8.52 µg/m³; pas de particules présentes]	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	5 h/jour, 5 jours par semaine, pendant 3 mois	<u>Test de reconnaissance d'objet :</u> - Augmentation du temps d'exploration du nouvel objet chez les animaux contrôles et M-NRDE - Diminution de l'indice de discrimination chez les animaux H-NRDE <u>Expression des gènes (ARNm) dans l'hippocampe des animaux exposés :</u> - Diminution significative du niveau d'ARN de la CAMK _{IV} chez les animaux H6NRDE par rapport aux animaux contrôles - Pas d'effets sur l'expression de NR1, NR2A et NR2B
Allen (2013)	Souris ♂ adultes (lignée C57BL/6J) (n=7-8/groupe) <u>Exposition 1 : PND25</u> <u>Exposition 2 : PND56</u>	<u>Exposition 1</u> Air filtré ou CAPS (Concentration moyenne : 96.4 µg/m³; diamètre <1µm) <u>Exposition 2</u> Air filtré ou CAPS (Concentration moyenne : 67.9 µg/m³; diamètre <1µm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	<u>Exposition 1</u> 4 h/jour PND29-PND32 PND35-PND38 <u>Exposition 2</u> 4 h/jour PND56-PND60	<u>Comportement opérant à PND71 :</u> - <i>Latence pour obtention de la récompense</i> Temps plus courts chez les animaux CAPS/CAPS par rapport aux groupes Air/Air et Air/CAPS, traduisant un biais accru en faveur de récompenses immédiates
Davis (2013)	Coupes d'hippocampe issus de souris ♂ âgés de 1 mois (lignée C57BL/6J) (n=7-10/expérience)	Suspension de nPM (concentration moyenne: 10 µg/mL)	<i>In vitro</i>	Incubation des coupes avec la suspension de nPM pendant 2h	<u>Niveaux protéiques :</u> - <i>CA1</i> - Augmentation du niveau protéique des sous- unités glutamatergiques GluA1, GluN2A et GluN2B, ainsi que de PSD95 et de la spinophiline - Pas de différences significatives concernant les niveaux protéiques de des sous-unités glutamatergiques GluA2, GluN1 et mGluR5, ni de la synaptophysine, CD_{11b}, GFAP ou NeuN - Diminution de la phosphorylation des sous-unités GluA1 et GluN2B - <i>DG</i> - Aucune différence sur les profils protéiques entre les 2 groupes d'animaux

Tableau 2a (suite). Effets d'une exposition répétée contrôlée directe aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP).

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Davis (2013) suite	Coupes d'hippocampe issus de souris ♂ âgés de 1 mois (lignée C57BL/6J) (n=7-10/expérience)	Suspension de nPM (concentration moyenne: 10 µg/mL)	<i>In vitro</i>	Incubation des coupes avec la suspension de nPM pendant 2h	<u>Production de radicaux libres</u> - Augmentation de la production dans les couches neuronales des diverses aires de l'hippocampe (CA1, CA2/3 et DG) <u>Electrophysiologie :</u> - Diminution de l'amplitude des EPSC des neurones CA1 - Pas de perturbations de la capacitance ou la résistance membranaire des neurones CA1 - Pas de perturbation des collatérales de Schaeffer
Allen (2014a)	35 paires de souris ♂ et ♀ (lignée C57BL/6) (n=8-12/groupe/sexe)	Air filtré ou CAPS (Concentration entre 15 et 240 µg/m³; diamètre <1µm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	<u>Exposition 1 (PN)</u> 4 h/jour PND4-PND7 PND10-PND13 Puis <u>Exposition 2 (AD)</u> 4 h/jour PND56-PND59	Tests comportementaux (PND71-240) : - <u>Conditionnement opérant (PND71-78) :</u> ▪ Altération du taux global d'exécution (↓♂C/A, ↑♀A/C) - <u>Tâche de reconnaissance d'objet (6 semaines) :</u> ▪ Diminution du temps passé avec le nouvel objet chez les animaux C/A par rapport aux autres groupes. ▪ Diminution du nombre d'approches et le temps passé avec le nouvel objet chez les animaux PN Quantification des monoamines (PND270) : - <u>Dérégulation des niveaux de dopamine</u> ▪ ♂C/A (taux d'HVA ↑Mes, ↓Str) ▪ ♀A/C (taux d'HVA ↑Mes ; taux DA ↓BO) ▪ ♀C/C (taux d'HVA ↑Hp) Quantification immunohistochimique (PND270) : - <u>Dérégulation des niveaux d'IBA1</u> ▪ Augmentation du niveau chez ♂C/C et ♂A/C - Profils neurochimiques et immunohistochimiques différents en fonction du type d'exposition (PN ou AD)

Tableau 2a (suite). Effets d'une exposition répétée contrôlée directe aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP).

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Allen (2014b)	18 souris ♂ et ♀ (lignée C57BL/6) (n=8-12/groupe/sexe)	Air filtré ou CAPS (Concentration moyenne : 200.000 particules en suspension/cm ³ , 96 µg/m ³ ; diamètre <1µm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	4 h/jour PND4-PND7 PND10-PND13	- Quantification anatomique : - Mis en évidence d'une ventriculomégalie (dilatation du ventricule latéral) chez les ♂CAPS, à PND14 (↑380%) et PND55 (↑178%) - Quantification immunohistochimique : GFAP ♂CAPS : Diminution dans le CC à PND14 et PND55 ; diminution dans le Hp à PND14 ♀CAPS PND14 : Augmentation dans le Hp, le CC et l'Ac Iba1 ♂CAPS : Augmentation dans le CC à PND14 et PND55 ; augmentation dans le Hp à PND55 Neurotransmetteurs ♂CAPS (PND14 et PND55) : ↑Glu dans le Hp et ↑DA turnover dans le Mes et le cortex ♂CAPS (PND55) : ↑NA dans cortex ♀CAPS (PND14 et PND55) : ↑HVA dans le Mes, ↑NE dans le cortex ; ↑5-HT et ↓GABA dans le Hp ♀CAPS (PND14) : ↑DA turnover dans le Hp ; ↓DA turnover dans le Mes Facteurs d'inflammation ♂CAPS (PND14 et PND55) : ↓Il₆ dans le Hp ; ↓Il_{1β} et ↓TNFα dans le Str ♂CAPS (PND14) : ↓Il_{1β} et ↓TNFα dans le Mes ♀CAPS (PND14 et PND55) : ↑Il_{1β} et ↑TNFα dans le Mes ♀CAPS (PND14) : ↓Il₆ dans le Str ♀CAPS (PND55) : ↓Il₆ dans le cortex ; ↑Il₆ dans le Mes

♀ : Femelle ; ♂ : Mâle ; **A/C** : Animaux Air/CAPS ; **Ac** : Commissure antérieure ; **BC** : Carbone élémentaire (Black carbon) ; **BHE** : Barrière hémato-encéphalique ; **BO** : Bulbe olfactif ; **BO+T** : Bulbe olfactif et tubercule olfactif ; **C/A** : Animaux CAPS/Air ; **CA1** : Corne d'Ammon-aire 1 ; **CA2/3** : Corne d'Ammon-aire 2 et 3 ; **CAPS** : Particules ambiantes concentrées ; **C/C** : Animaux CAPS/ CAPS ; **DA** : Dopamine ; **DE** : Fumées issues de moteur diesel ; **DEP** : Particules issues de moteur diesel ; **DG** : Gyrus denté ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **EPSC** : Courant post-synaptique exciteur ; **GABA** : Acide γ-aminobutyrique ; **Glu** : Glutamate ; **HVA** : Acide homovanillique ; **Hp** : Hippocampe ; **iNOS** : Oxyde nitrique synthase – forme inductible ; **LTA** : Acide lipotéichoïque ; **Mes** : Mésencéphale ; **MO** : Muqueuse olfactive ; **MT I-II** : Métallothionéine I-II ; **NA** : Noradrénaline ; **NRDE ou NRDEP** : Fumées issues de moteur diesel enrichies en nanoparticules ; **NPV** : Noyau paraventriculaire ; **NSO** : Neurone sensoriel olfactif ; **PM** : Matière particulaire ; **Str** : Striatum ; **PND** : Jour de vie post-natale.

Tableau 2b. Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Sugamata (2006a, 2006b)	Souris (lignée ICR) (n=10 femelles gestantes/groupe)	DE (0.3, 1 ou 3 mg/m ³)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	GD2 – GD16	Souris adulte (11 semaines) : - Augmentation du nombre de cellules caspase 3⁺ - Augmentation du nombre de cellules de Purkinje dans le cervelet - Mise en évidence de signes d'apoptose dans les cellules périthéliales granulaires et les cellules de Purkinje. - Présence de particules dans le cytoplasme des GP - « Swelling » des pieds astrocytaires entourant les capillaires cérébraux
Hougaard (2008)	Souris (lignée C57BL/6) (n=20 femelles gestantes/groupe)	DEP (SRM 2975, 19 mg/m ³ ; diamètre=240 nm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	GD9 – GD19	Souris PND0 à PND22 : - Diminution du poids corporel des animaux Souris ♀ adulte (2 mois) : - Tendance à une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémoire (piscine de Morris)
Yokota (2009, 2013)	Souris (lignée ICR)	DE Moteur diesel 2369 cc PM (1mg/m ³) CO (2.67 ppm) NO ₂ (0.23 ppm) SO ₂ (< 0.01 ppm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	8 h/jour, 5 jours par semaine, de GD2 à GD17	2009-> Souris adulte ♂ (4-5 semaines) : - Diminution de la locomotion spontanée - Diminution du DA turnover au niveau du noyau Accumbens 2013-> Souris adulte ♂ (4-5 semaines) : - Diminution du temps passé sur le rotor dans le test d'agrippage, mais pas de différences significatives du temps passé sur la tige dans le test de suspension - Le test d'évitement des falaises a révélé que les souris exposées passaient plus de temps dans le coin et tombaient d'un bécier en verre inversé par rapport aux souris témoins. Souris adulte ♂ (3 et 6 semaines) : - A 3 semaines : ▪ Diminution des taux de MHPG et du NA turnover dans le cervelet ▪ Diminution du taux de DA dans le CPF ▪ Augmentation du taux de DA et de cas métabolites dans l'amy ▪ Augmentation du taux de 5-HT et de son métabolite (5-HIAA) dans l'amy

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Yokota (2009, 2013) suite	Souris (lignée ICR)	DE Moteur diesel 2369 cc PM (1mg/m ³) CO (2.67 ppm) NO ₂ (0.23 ppm) SO ₂ (< 0.01 ppm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	8 h/jour, 5 jours par semaine, de GD2 à GD17	Souris adulte ♂ (3 et 6 semaines) : <u>- A 6 semaines :</u> - Diminution des taux de MHPG, de NM, du rapport MHPG/NA et du rapport NM/NA dans le cervelet - Augmentation du taux de NA dans l'hyp - Augmentation du taux de DOPAC dans l'amy - Augmentation du niveau de 5-HT dans le CPF ; augmentation du taux de 5-HIAA dans l'Hyp
Tsukue (2009)	100 souris gestantes (lignée ICR) (Animaux divisés en 4 groupes)	<u>Air filtré</u> [PM (4 µg/m ³); NO ₂ (0.12 ppm); NO (0.06 ppm); SO ₂ (0.02 ppm); CO ₂ (651 ppm)] <u>Dose DE-faible</u> [PM (0.3 mg/m ³); NO ₂ (1.34 ppm); NO (3.24 ppm); SO ₂ (0.08 ppm); CO ₂ (1881 ppm); CO(0.86 ppm)] <u>Dose DE-moyen</u> [PM (1 mg/m ³); NO ₂ (4.62 ppm); NO (11.75 ppm); SO ₂ (0.21 ppm); CO ₂ (4922 ppm); CO(8.59 ppm)] <u>Dose DE-fort</u> [PM (3 mg/m ³); NO ₂ (10.52 ppm); NO (27.49 ppm); SO ₂ (0.39 ppm); CO ₂ (9718 ppm); CO(24.46 ppm)]	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	<u>Exposition fœtale</u> 12 h/jour, 7 jours par semaine, de GD2 à GD16 (n=5-8 femelles gestantes/groupe) <u>Exposition néonatale</u> 12 h/jour, 7 jours par semaine, de PND0 à PND16 (n=15 femelles gestantes/groupe)	Exposition fœtale (par rapport au groupe contrôle) : <u>- Poids corporel :</u> - A PND5 : Diminution chez les ♀DE-faible et les ♀DE-fort <u>- Poids du cerveau :</u> - A PND5 : Diminution chez les ♂DE-faible <u>- Expression des gènes :</u> ERα - A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-moyen et les ♀DE-fort - A PND5 : Augmentation chez les ♂DE-fort - A PND16 : Augmentation chez les ♀DE-faible et les ♀DE-moyen ERβ - A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-moyen - A PND5 : Augmentation chez les ♂DE- moyen AR - A PND5 : Diminution chez les ♂DE-faible Aromatase - A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-fort - A PND5 : Augmentation chez les ♂DE- fort TRα - A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-fort - A PND5 : Augmentation chez les ♂DE-faible et les ♂DE-moyen Neurogranine - A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-faible - A PND5 : Augmentation chez les ♀DE-faible, les ♀DE-moyen et les ♀DE-fort

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Tsukue (2009) suite	100 souris gestantes (lignée ICR) (Animaux divisés en 4 groupes)	<u>Air filtré</u> [PM (4 µg/m³); NO₂ (0.12 ppm); NO (0.06 ppm); SO₂ (0.02 ppm); CO₂ (651 ppm)] <u>Dose DE-faible</u> [PM (0.3 mg/m³); NO₂ (1.34 ppm); NO (3.24 ppm); SO₂ (0.08 ppm); CO₂ (1881 ppm); CO(0.86 ppm)] <u>Dose DE-moyen</u> [PM (1 mg/m³); NO₂ (4.62 ppm); NO (11.75 ppm); SO₂ (0.21 ppm); CO₂ (4922 ppm); CO(8.59 ppm)] <u>Dose DE-fort</u> [PM (3 mg/m³); NO₂ (10.52 ppm); NO (27.49 ppm); SO₂ (0.39 ppm); CO₂ (9718 ppm); CO(24.46 ppm)]	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	<u>Exposition fœtale</u> 12 h/jour, 7 jours par semaine, de GD2 à GD16 (n=5-8 femelles gestantes/groupe) <u>Exposition néonatale</u> 12 h/jour, 7 jours par semaine, de PND0 à PND16 (n=15 femelles gestantes/groupe)	Exposition fœtale (par rapport au groupe contrôle) : - <u>Expression des gènes :</u> CYP1A1 ▪ A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-fort ; augmentation chez les ♂DE-moyen HO-1 ▪ A PND5 : Augmentation chez les ♀DE-faible MT-1 ▪ A PND2 : Augmentation chez les ♂DE-fort ▪ A PND16 : Augmentation chez les ♂DE-faible Exposition néonatale (par rapport au groupe contrôle) : - <u>Poids corporel :</u> ▪ A PND5 : Augmentation chez les ♂DE-faible ; augmentation chez les ♀DE-fort ▪ A PND16 : Augmentation chez les ♂DE-faible et les ♂DE-moyen ; augmentation chez les ♀DE-faible - <u>Poids du cerveau :</u> ▪ A PND2 : Diminution chez les ♀DE-moyen ▪ A PND16 : Augmentation chez ♂DE-faible; augmentation chez les ♀DE-faible et les ♀DE-moyen - <u>Expression des gènes :</u> ERα ▪ A PND2 : Augmentation chez les ♀DE-faible ; Augmentation chez les ♂DE-fort ▪ A PND5 : Augmentation chez les ♀DE-faible ▪ A PND16 : Augmentation chez les ♀DE-moyen ERβ ▪ A PND2 : Augmentation chez les ♂DE- fort TRα et BDNF ▪ A PND5 : Augmentation chez les ♀DE-moyen Neurogranine ▪ A PND16 : Augmentation chez les ♂DE-moyen ; augmentation chez les ♀DE-faible, les ♀DE-moyen et les ♀DE-fort CYP1A1 ▪ A PND5 : Augmentation chez les ♀DE-fort ; augmentation chez les ♂DE-moyen

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Tsukue (2009) suite	100 souris gestantes (lignée ICR) (Animaux divisés en 4 groupes)	<u>Air filtré</u> [PM (4 µg/m³); NO₂ (0.12 ppm); NO (0.06 ppm); SO₂ (0.02 ppm); CO₂ (651 ppm)] <u>Dose DE-faible</u> [PM (0.3 mg/m³); NO₂ (1.34 ppm); NO (3.24 ppm); SO₂ (0.08 ppm); CO₂ (1881 ppm); CO(0.86 ppm)] <u>Dose DE-moyen</u> [PM (1 mg/m³); NO₂ (4.62 ppm); NO (11.75 ppm); SO₂ (0.21 ppm); CO₂ (4922 ppm); CO(8.59 ppm)] <u>Dose DE-fort</u> [PM (3 mg/m³); NO₂ (10.52 ppm); NO (27.49 ppm); SO₂ (0.39 ppm); CO₂ (9718 ppm); CO(24.46 ppm)]	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	<u>Exposition fœtale</u> 12 h/jour, 7 jours par semaine, de GD2 à GD16 (n=5-8 femelles gestantes/groupe) <u>Exposition néonatale</u> 12 h/jour, 7 jours par semaine, de PND0 à PND16 (n=15 femelles gestantes/groupe)	HO-1 - A PND2 : Augmentation chez les ♂DE-faible et les ♂DE-fort - A PND5 : Augmentation chez les ♂DE-moyen et les ♂DE-fort - A PND16 : Augmentation chez les ♂DE-fort MT-1 - A PND2 : Diminution chez les ♀DE-moyen et les ♀DE-fort - A PND5 : Diminution chez les ♂DE-fort
Suzuki (2010)	26 souris (lignée ICR) (n=12-14 femelles gestantes/groupe)	DE Moteur diesel 2369 cc PM (171 µg/m³, concentration moyenne : 1.06×10⁴ particules en suspension/cm³) CO (1.25 ppm) NO₂ (0.04 ppm) SO₂ (< 0.01 ppm)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	8 h/jour, 5 jours par semaine, de GD2 à GD16	Souris adulte ♂ (4-5 semaines) : - Diminution de la locomotion spontanée - Augmentation du niveau de dopamine et noradrénaline (et de ses métabolites) dans le CPF

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Bolton (2013)	Souris (lignée C57BL/6) (n=8-10 femelles gestantes/groupe)	DEP (50µg de particules dans 50µL de PBS) Ou VEH (50µL de PBS) +/- Stress maternel (NR)	Aspiration oropharyngée	Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total)	<u>Analyse des cytokines cérébrales fœtales (GD18) :</u> - Pas d'altération du niveau d'IL1β - Effet sexe-traitement sur le niveau d'IL10 (↓ ♂/↑♀) <u>Expression des gènes (PND30) :</u> - Pas d'altération du niveau d'IL1β - Effet sexe-DEP sur le niveau d'IL10 (↓ ♂/↑♀) <u>Expression des gènes (PND100) :</u> - Augmentation du niveau d'IL1β les ♂ DEP - Effet NR-DEP et diminution du niveau d'IL10 <u>Association avec le stress maternel (NR)</u> - Diminution du poids corporel à la naissance sous effet de NR (normalisation à PND8) - Augmentation du niveau de corticostérone sérique chez le ♂ (PND1) - Pas d'effet sur le comportement maternel entre PND2 et PND9 (temps passé dans le nid, toilettage ou allaitement des souriceaux, labyrinthe zéro élevé) - Niveau d'expression de TLR4 et Casp1 plus important chez les ♂ DEP/NR par rapport aux autres groupes - ♂ DEP/NR présentent un temps de freezing moins important que les autres groupes (conditionnement de la peur par signaux contextuels) - ♂ et ♀ passent plus de temps dans les bras fermées du labyrinthe zéro élevé
Davis (2013)	Culture de neurones primaires de rats à E18	Suspension de nPM (concentration moyenne: 200µg/mL)	<i>In vitro</i>	Incubation des cultures (cultures de 7 ou 14 jours) avec la suspension de nPM pendant 2h	<u>Niveaux protéiques :</u> - Augmentation du niveau protéique deGluN2B, ainsi que de PSD95 et de la spinophiline - Diminution du niveau protéique deGluA1 - Diminution de la phosphorylation des sous-unités GluA1 et GluN2B

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Bolton (2014)	Souris (lignée C57BL/6) <u>Cohorte 1</u> (n=12 femelles gestantes) <u>Cohorte 2</u> (n=8 femelles gestantes)	DEP (50µg de particules dans 50µL de PBS) ou VEH (50µL de PBS)	Aspiration oropharyngée	<u>Cohorte 1</u> (n=5 femelles gestantes) Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) Puis Adultes (4-5 semaines) mis en régime LFD ou HFD pendant 9 semaines <u>Cohorte 2</u> (n=3 femelles gestantes) Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) +/- injection à PND30 de LPS (165 µg/kg) ou PBS	<u>Cohorte1</u> Souris adulte (13-14 semaines) : <u>- Poids corporel et alimentation :</u> - Augmentation du poids corporel des animaux HFD par rapport aux LFD dès le 3^{ème} jour de mise en régime. - Augmentation significative du poids corporel des ♂DEP/HFD par rapport aux ♂VEH/HFD ; pas de différence entre les ♀DEP/HFD et les ♀VEH/HFD - Le nombre total de kilocalories consommées était plus élevé dans les groupes HFD que dans les groupes LFD. <u>- Comportement :</u> OF - Diminution du niveau d'activité chez les animaux HFD par rapport aux LFD - Diminution significative du niveau d'activité des ♂DEP/HFD par rapport aux ♂VEH/HFD ; pas de différence entre les ♀DEP/HFD et les ♀VEH/HFD EPM - Tendance des ♂VEH/HFD à être moins explorateurs (↓head-dipping ; ↑temps passé dans les bras fermés) <u>- Challenge à l'insuline :</u> - Niveaux d'insuline plus importants chez les ♂VEH/HFD que chez les autres groupes. - Les animaux HFD présentent une diminution initiale atténuée de la glycémie après injection d'insuline par rapport aux animaux LFD ; effet plus prononcé chez les ♂HFD que les ♀HDF. - Lors de la réponse glycémique maximale (30 minutes après l'injection d'insuline), augmentation de la glycémie en réponse à l'insuline chez les ♂VEH/HFD.

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Bolton (2014) suite	Souris (lignée C57BL/6) <u>Cohorte 1</u> (n=12 femelles gestantes) <u>Cohorte 2</u> (n=8 femelles gestantes)	DEP (50µg de particules dans 50µL de PBS) ou VEH (50µL de PBS)	Aspiration oropharyngée	<u>Cohorte 1</u> (n=5 femelles gestantes) Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) Puis Adultes (4-5 semaines) mis en régime LFD ou HFD pendant 9 semaines <u>Cohorte 2</u> (n=3 femelles gestantes) Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) +/- injection à PND30 de LPS (165 µg/kg) ou PBS	- Marquage microglial/astrocytaire : Tissus adipeux - Augmentation des niveaux d'expression génique de CC2 et TLR4 chez les animaux HDF ; effet plus prononcé chez les ♂HFD que les ♀HDF. - Niveau d'expression génique de CD11b plus important chez les ♂DEP/HFD que chez les autres groupes Hippocampe - Augmentation des niveaux d'expression génique de TLR4, CX3CR1 et CD11b chez les ♂DEP/HFD ; pas de différences significatives chez les femelles - Diminution du niveau d'expression génique de GFAP chez les ♀HFD ; pas de différences significatives chez les mâles - Cytométrie de flux : - Augmentation du pourcentage de macrophages chez les animaux HFD dans le Hp et le Hyp (analysés ensemble). - Intensité de fluorescence médiane plus importante chez les ♂DEP/HFD dans le Hyp - Pas de différences significatives sur le pourcentage de cellules microgliales entre les divers groupes. - Augmentation du pourcentage de macrophages chez les ♀HFD. <u>Cohorte2</u> Souris adulte (PND30) : - Challenge au LPS : IL1β sérique - Niveau plus important chez les ♀LPS que chez les ♂LPS - Augmentation du niveau chez les ♂DEP par rapport aux autres groupes mâles. - Pas de différences significatives entre les ♀DEP/LPS et les ♀VEH/LPS

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Bolton (2014) suite	Souris (lignée C57BL/6) <u>Cohorte 1</u> (n=12 femelles gestantes) <u>Cohorte 2</u> (n=8 femelles gestantes)	DEP (50µg de particules dans 50µL de PBS) ou VEH (50µL de PBS)	Aspiration oropharyngée	<u>Cohorte 1</u> (n=5 femelles gestantes) Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) Puis Adultes (4-5 semaines) mis en régime LFD ou HFD pendant 9 semaines <u>Cohorte 2</u> (n=3 femelles gestantes) Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) +/- injection à PND30 de LPS (165 µg/kg) ou PBS	<u>Cohorte2</u> Souris adulte (PND30) : - <u>Challenge au LPS :</u> IL1β dans le cerveau - Niveau plus important chez les animaux LPS que chez les ♂LPS (Hyp, Hp, CPF et Cp analysés ensemble) - Pas de réponse centrale différentielle au LPS due au traitement prénatal ou au sexe.
Yokota (2015)	30 Souris gestantes (lignée ICR) (n=15 femelles gestantes/groupe)	Suspension de PM _{2.5} dans une solution saline (diamètre moyen : 126 nm ; concentration moyenne: 25µg/m ³) ou VEH (solution saline)	Injection sous-cutanée	Administration de 200mg/kg de poids corporel à GD6, GD9, GD12, GD15 et GD18 (dose totale : 1mg/kg de poids corporel)	2015-> Souris adulte ♂ (9-10 semaines) : - <u>Comportement :</u> - Diminution du temps passé dans le quadrant cibles dans le test de mémoire spatiale (piscine de Morris) - Aucune différence dans le test d'évitement et l'OF entre les deux groupes d'animaux - <u>Expression des gènes :</u> - Diminution du niveau d'expression de NR2A dans l'Hp - Aucune différence sur les niveaux d'expression de NR2B

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Yokota (2016)	30 Souris gestantes (lignée ICR) (n=15 femelles gestantes/groupe)	Suspension de PM _{2.5} dans une solution saline (diamètre moyen : 126 nm ; concentration moyenne: 25µg/m ³) ou VEH (solution saline)	Injection sous-cutanée	Administration de 200mg/kg de poids corporel à GD6, GD9, GD12, GD15 et GD18 (dose totale : 1mg/kg de poids corporel)	2016-> Souris adulte ♂ (9-10 semaines) : <u>- Comportement (par rapport aux animaux contrôles) :</u> ▪ Diminution du nombre de penchements de la tête (head-dipping) lors du test de la planche à trous ▪ Diminution du nombre d'entrées et du temps passé dans le bras ouvert (EPM). ▪ Aucune différence sur la locomotion spontanée <u>- Analyse du système sérotoninergique (par rapport aux animaux contrôles) :</u> ▪ Augmentation du taux de 5-HT dans le PVN ▪ Augmentation des taux de 5-HT et de 5-HIAA dans le DRN ▪ Le nombre de neurones 5-HT⁺ dans le DRN ne diffère pas entre les deux groupes d'animaux ▪ Augmentation du nombre de cellules FosB⁺/5-HT⁺ dans le DRN
Bolton (2017)	<u>Expérience 1</u> Souris ♂ TLR4^{-/-} et ♀ TLR4^{+/-} (descendance à ≈ 50% par phénotype) (lignée C57BL/6) (n=7-9 femelles gestantes/groupe) <u>Expérience 2</u> Souris adultes (lignée C57BL/6) (n=7-9 femelles gestantes/groupe)	DEP (50µg de particules dans 50µL de PBS) ou VEH (50µL de PBS)	Aspiration oropharyngée	<u>Expérience 1</u> Administration GD2, GD5, GD8, GD12 et GD16 <u>Expérience 2</u> Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) +/- injections à PND30 de LPS (165 µg/kg) ou PBS	<u>Expérience 1 (GD18) :</u> <u>- Effets DEP (par rapport à VEH) :</u> ▪ Tendance à l'augmentation d'IL1β chez les animaux ; pas d'effet sur les niveaux d'IL10. ▪ Diminution du nombre de cellules microgliales « rondes » chez les femelles dans le PCx. Profil similaire concernant les cellules microgliales « stout » dans le DG et la CA2/3. ▪ Augmentation du niveau de microglies « thick » chez les femelles DEP- TLR4^{-/-} par rapport aux autres groupes <u>- Effets DEP- TLR4^{+/-} (par rapport aux VEH- TLR4^{+/-})</u> ▪ Augmentation du rapport IL1β/IL10 ▪ Augmentation du volume du cortex pariétal (PCx) et DG ▪ Augmentation du nombre de cellules microgliales « rondes » chez les mâles dans le PCx. Profil similaire concernant les cellules microgliales « stout » dans le DG, la CA1 et la CA2/3. ▪ Diminution du nombre de cellules microgliales « stout » chez les femelles dans la CA1

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Bolton (2017) suite	<u>Expérience 1</u> Souris ♂ TLR4^{-/-} et ♀ TLR4^{+/-} (descendance à ≈ 50% par phénotype) (lignée C57BL/6) (n=7-9 femelles gestantes/groupe) <u>Expérience 2</u> Souris adultes (lignée C57BL/6) (n=7-9 femelles gestantes/groupe)	DEP (50µg de particules dans 50µL de PBS) ou VEH (50µL de PBS)	Aspiration oropharyngée	<u>Expérience 1</u> Administration GD2, GD5, GD8, GD12 et GD16 <u>Expérience 2</u> Administration 3 fois de GD2 à GD17 (6 doses au total) +/- injections à PND30 de LPS (165 µg/kg) ou PBS	<u>Expérience 2 (PND30) :</u> - <i>Effets DEP (par rapport à VEH) :</i> ▪ Diminution du volume du PCx chez les ♂ DEP ▪ Tendance à la diminution du nombre de cellules microgliales longues « thick » chez les ♀ DEP dans le PCx - <i>Marquages Iba1 et NeuN (dans le PCx) :</i> ▪ Marquage plus important de NeuN⁺ chez les mâles que chez les femelles (indépendamment des traitements) ; pas d'effet sur le marquage Iba1⁺ ▪ Le nombre de chevauchements des marquages microglie-neurone est plus important chez les animaux DEP par rapport aux contrôles (VEH/PBS ou VEH/LPS) ; chevauchements plus important chez les mâles que chez les femelles (indépendamment des traitements) - <i>Reconstruction microgliale 3D (dans le PCx) :</i> ▪ Le volume microglial global moyen est plus important chez les animaux DEP par rapport aux contrôles ▪ Le volume microglial moyen du corps cellulaires est plus important chez les animaux DEP par rapport aux contrôles ▪ Le volume de chevauchements des marquages microglie-neurone (global et par les corps cellulaires) est plus important chez les ♂ DEP par rapport aux ♂ VEH ; chevauchements plus important chez les ♀ VEH que les ♂ VEH - <i>Effets DEP/LPS (par rapport aux VEH/LPS)</i> ▪ Augmentation du nombre de cellules microgliales longues « thick » chez les ♂ DEP/LPS ▪ Tendance à la diminution du nombre de cellules microgliales longues « thick » chez les ♂ DEP/LPS ▪ - Les animaux conservent la même quantité globale de microglie dans la DG en convertissant une microglie longue « thin » en une microglie longue « thick » en réponse au LPS.

Tableau 2b (suite). Effets d'une exposition gestationnelle répétée contrôlée aux fumées issues de moteur diesel (DE) et des particules issues de moteur diesel (DEP) sur le devenir neurodéveloppemental de l'individu.

Auteur	Animal	Exposition			Principaux constats
		Type de polluant	Méthode d'exposition	Période d'exposition	
Klocke (2017)	Souris âgées de 8-10 semaines (lignée B6C3F1) (n=8 femelles gestantes/groupe)	CAPS (concentration moyenne: 92.69 µg/m ³)	Chambre d'inhalation (exposition du corps entier)	6 h/jour GD0.5-GD16.5	<u>PND11-15</u> : - Ventriculomégalie (élargissement des ventricules latéraux) - Réduction de la surface de l'hippocampe - Augmentation de l'activation microgliale - Altération du corps calleux (augmentation de la surface, hypermyélinisation, diminution du nombre de cellules microgliales) - Augmentation des dépôts de fer dans le corps calleux des femelles issues de mères exposées

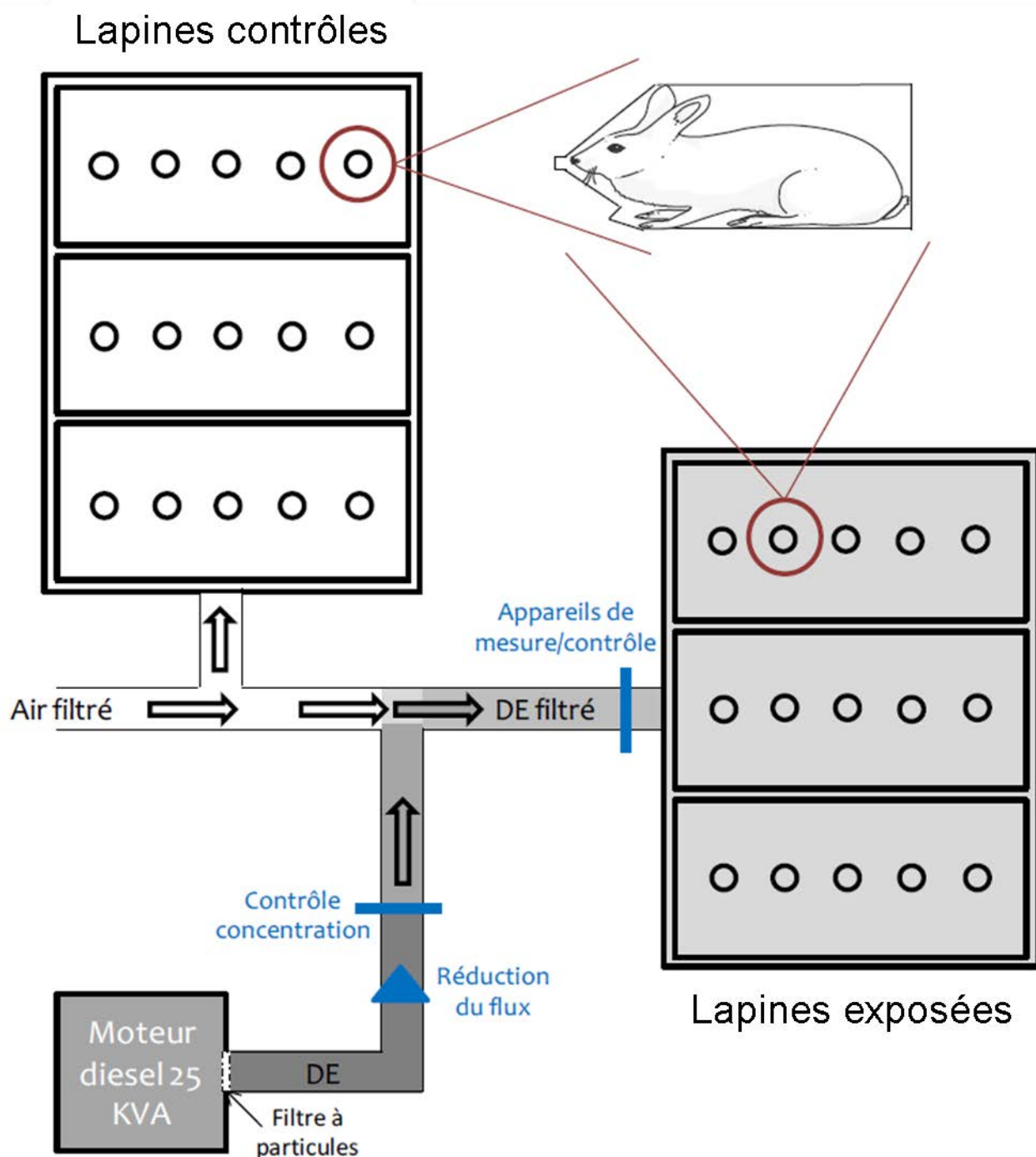
♀ : Femelle ; ♂ : Mâle ; 5-HIAA : 5-hydroxyindolacétique ; 5-HT : Sérotonine ; **amy** : Amygdale ; **AR** : Récepteur aux androgènes ; **BDNF** : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; **Cp** : cortex pariétal ; **CPF** : cortex préfrontal ; **DA** : Dopamine ; **DE** : Fumées issues de moteur diesel ; **DEP** : Particules issues de moteur diesel ; **DRN** : Noyau du Raphé dorsal ; **E** : Jour embryonnaire ; **EPM** : Labyrinthe en croix surélevé ; **ER** : Récepteur à l'œstrogène ; **GD** : Jour de gestation ; **DOPAC** : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique ; **HFD** : Régime riche en calories ; **HVA** : Acide homovanillique ; **Hyp** : Hypothalamus ; **Hp** : Hippocampe ; **LFD** : Régime pauvre en calories ; **MHPG** : 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol ; **NA** : Noradrénaline ; **NM** : chlorhydrate de normétanéphrine ; **nPM** : Matière nanoparticulaire ; **OF** : Open field ; **PBS** : Tampon phosphate ; **PCx** : Cortex pariétal ; **PM** : Matière particulaire ; **PVN** : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; **PND** : Jour de vie post-natale ; **TR** : Récepteur aux hormones thyroïdiennes ; **VEH** : Véhicule.



Annexe 2 : Présentation de la salle d'hébergement des lapines à l'INRA de Jouy-en- Josas. Photographie représente une cellule contenant les cages individuelles dans lesquelles évoluent les lapines. Les lapines ont été hébergées dans les locaux de l'UCEA (Unité Commune d'Expérimentation Animale) sur le site INRA de Jouy-en-Josas. On peut voir une plateforme pour l'enrichissement, ainsi que les trémies pour la distribution de la nourriture individuelle. Photos reprise du travail doctoral du Dr. Sarah Valentino ([Valentino et al, 2016b](#)).



Annexe 3 : Dispositifs de contention mis en œuvre pour l'exposition par inhalation « nose only » chez la lapine gestante. **A gauche** sont présentés les tubes de contention, créés spécialement pour cette expérimentation. Ces derniers sont faits en plexiglas avec un fond en aluminium sous lequel un réservoir collecte les urines des lapines. Un morceau de plexiglas est placé à l'arrière du tube afin que la lapine ne puisse pas reculer pendant l'exposition. Enfin une plaque d'aluminium clôture la fermeture du tube. **A droite** sont présentées les lapines dans le tube de contention. On note l'ouverture à l'avant du tube au niveau duquel les animaux reçoivent le flux d'air (contaminé ou non-contaminé) au niveau du museau, grâce à un petit module d'exposition. Photos reprise du travail doctoral du Dr. Sarah Valentino ([Valentino et al, 2016b](#)).



Annexe 4a: Schéma du fonctionnement d'exposition du laboratoire mobile MAPCEL utilisé pour l'inhalation « nose only » des lapines gestantes. Le moteur qui génère les gaz d'échappement diesel possède un filtre à particules. Le flux de gaz d'échappement de moteur diesel est réduit puis mélangé à de l'air purifié. La concentration en particules est contrôlée et maintenue à la valeur souhaitée. Plusieurs appareils connectés au flux de gaz d'échappement permettent la mesure et le contrôle de la concentration en gaz (oxydes d'azote, monoxyde et dioxyde de carbone), de la température (21-23°C) et de l'humidité relative (40-45%). **DE** : gaz d'échappement de moteur diesel ; **KVA** : Kilovoltampère. Schéma repris du travail doctoral du Dr. Sarah Valentino (Valentino et al, 2016b).



Annexe 4b : Dispositif d'exposition MAPCEL utilisé pour l'inhalation « nose only » des lapines gestantes. A gauche, est présenté l'extérieur du laboratoire mobile MAPCEL (Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory), utilisé pour la mise en exposition des lapines. L'exposition a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Flemming Cassee du National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). **A droite** est présenté l'intérieur du laboratoire mobile MAPCEL. Le module d'exposition (évoqué en annexe 2) et relié à un moteur diesel 25KVA de l'entreprise Loxam, moteur de référence de l'équipe du RIVM. Photos présentées avec l'autorisation du Dr. Pascale Chavatte-Palmer (coordinatrice du programme ANR EPPAP).

Annexe 5 : Article « Repeated gestational exposure to diesel engine exhaust affects the fetal olfactory system and alters olfactory-based behavior in rabbit offspring » de **Bernal-Meléndez E**, Lacroix MC, Bouillaud P, Callebert J, Olivier B, Persuy MA, Durieux D, Rousseau-Ralliard D, Aioun J, Cassee F, Couturier-Tarrade A, Valentino S, Chavatte-Palmer P, Schroeder H and Baly C., publié en 2019 dans *Particle and Fibre Toxicology*.

RESEARCH

Open Access



Repeated gestational exposure to diesel engine exhaust affects the fetal olfactory system and alters olfactory-based behavior in rabbit offspring

Estefanía Bernal-Meléndez^{1,2}, Marie-Christine Lacroix¹, Pascaline Bouillaud², Jacques Callebert³, Benoit Olivier², Marie-Annick Persuy¹, Didier Durieux¹, Delphine Rousseau-Ralliard⁴, Josiane Aioun⁴, Flemming Cassee^{5,6}, Anne Couturier-Tarrade⁴, Sarah Valentino⁴, Pascale Chavatte-Palmer⁴, Henri Schroeder² and Christine Baly^{1*} 

Abstract

Background: Airborne pollution, especially from diesel exhaust (DE), is known to have a negative effect on the central nervous system in exposed human populations. However, the consequences of gestational exposure to DE on the fetal brain remain poorly explored, with various effects depending on the conditions of exposure, as well as little information on early developmental stages. We investigated the short-term effects of indirect DE exposure throughout gestation on the developing brain using a rabbit model. We analyzed fetal olfactory tissues at the end of gestation and tested behaviors relevant to pups' survival at birth.

Pregnant dams were exposed by nose-only inhalation to either clean air or DE with a content of particles (DEP) adjusted to 1 mg/m³ by diluting engine exhaust, for 2 h/day, 5 days/week, from gestational day 3 (GD3) to day 27 (GD27). At GD28, fetal olfactory mucosa, olfactory bulbs and whole brains were collected for anatomical and neurochemical measurements. At postnatal day 2 (PND2), pups born from another group of exposed or control female were examined for their odor-guided behavior in response to the presentation of the rabbit mammary pheromone 2-methyl-3-butyn-2-ol (2MB2).

Results: At GD28, nano-sized particles were observed in cilia and cytoplasm of the olfactory sensory neurons in the olfactory mucosa and in the cytoplasm of periglomerular cells in the olfactory bulbs of exposed fetuses. Moreover, cellular and axonal hypertrophies were observed throughout olfactory tissues. Concomitantly, fetal serotonergic and dopaminergic systems were affected in the olfactory bulbs. Moreover, the neuromodulatory homeostasis was disturbed in a sex-dependent manner in olfactory tissues. At birth, the olfactory sensitivity to 2MB2 was reduced in exposed PND2 pups.

Conclusion: Gestational exposure to DE alters olfactory tissues and affects monoaminergic neurotransmission in fetuses' olfactory bulbs, resulting in an alteration of olfactory-based behaviors at birth. Considering the anatomical and functional continuum between the olfactory system and other brain structures, and due to the importance of monoamine neurotransmission in the plasticity of neural circuits, such alterations could participate to disturbances in higher integrative structures, with possible long-term neurobehavioral consequences.

Keywords: Airborne pollution, Diesel exhaust, Nano-particulate matter, Gestational exposure, Olfactory dysfunction, Olfactory toxicity, Bulbar neurotransmitter disturbances, Pheromonal response, Olfactory-based behavior

* Correspondence: christine.baly@inra.fr

¹NeuroBiologie de l'Olfaction, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Air pollution is a mixture of several components, among which particulate matter (PM) is believed to be the most widespread threat to human health and has been heavily implicated in various human diseases [1–3]. Among these components, diesel exhaust particles (DEP) represent a major source of PM-polluted air in urban environments (reviewed in [4, 5]). Several lines of research have led to the concern that the central nervous system (CNS) represents a relevant target for such particles through chronic inflammation, disruption of the blood-brain barrier and microglia activation, which may contribute to CNS diseases [6–10]. Even though few studies have examined the toxic effects following a controlled exposure to DE in humans [11, 12], increasing epidemiological evidence, as well as experimental and in vitro studies, have demonstrated that direct exposure to air pollutants lead to adverse neuropsychological effects such as decreased cognitive function, depressive symptoms, and neurophysiological disturbances, including olfactory dysfunction and auditory deficits [8, 13–17], along with early hallmarks of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) in elders [16–20]. Emerging data indicate that children may be particularly susceptible to air pollution-induced neurotoxicity, given their relatively immature detoxification mechanisms [13, 19, 21–26]. Consequently, gestational exposure to airborne pollution may affect fetal brain development during critical phases and might predispose the individual to neurodevelopmental and neurodegenerative diseases later in life [19].

In the last decade, epidemiological studies have highlighted a possible role of gestational exposure to air pollution in the onset of neurodevelopmental disorders, including autistic spectrum and attention deficit hyperactivity disorders, along with other learning and behavioral disabilities [24–32]. Moreover, experimental studies have shown that gestational exposure to ambient PM induces oxidative stress and inflammation as well as structural and molecular alterations of neurons in brain tissues, that might lead to postnatal neurobehavioral disorders [33–38]. Indeed, DE exposure is related to apoptotic and “swelling” phenomena in offspring neural cells and astrocyte end-feet surrounding brain capillaries, supporting the hypothesis of physiopathological abnormalities and the subsequent neurobehavioral disorders [37, 39, 40].

Interestingly, imbalances in the monoaminergic systems related to various neurocognitive disorders have also been noticed. Studies performed by Yokota et al. in mice [41–43] pointed out that maternal exposure to DE leads to perturbations of the offspring's dopaminergic, noradrenergic and serotonergic systems in specific brain regions that could be related to motor coordination and impulsive behavior disturbances. Nevertheless, some incongruence remains as another study has revealed contradictory monoaminergic

changes [44], possibly based on different mixtures or routes used for exposure. Moreover, there are still some controversies on their effects during fetal life on cognitive function. Indeed, one study examining mice exposed to DEP in utero showed deficits in the Morris water maze test, but no differences in the passive avoidance learning test [45], whereas other studies reported no effect on learning and memory tasks [36, 46]. Furthermore, studies have shown that DE, DEP, black carbon, or NO₂ exposure during pregnancy in mice could cause motor deficits in offspring and affect central glutamatergic and dopaminergic neurochemistry in a sex-specific manner [41, 44, 45, 47, 48].

Interestingly, olfactory dysfunction, which is a very common feature in numerous neurodegenerative disorders (such as AD and PD) preceding the cognitive and motor symptoms (reviewed by [49, 50]), has been described after direct exposure to air pollution in rodents, dogs and humans [13, 15, 51–53]. The studies conducted to date have shown some hallmarks of AD-like and PD-like neuropathology in human olfactory bulbs (OB), as reflected by neuroinflammation, oxidative stress, DNA damage, and up-regulation of neurodegenerative-disease markers [15, 52]. Post-mortem studies in humans have identified the accumulation of ultrafine particulate matter (UFP, i.e., particles with mean diameters < 100 nm) and inflammatory mediators in olfactory mucosa (OM) and OBs of children and young adults from highly polluted areas of Mexico City [13, 51, 53], suggesting that olfactory pathologies may be considered as a reliable early marker, indicative of disturbances induced in higher integrative brain structures [49, 50, 53–55]. Nevertheless, the mechanisms linking olfactory dysfunction, pollution and the development of neurodegenerative disorders are incompletely understood. Direct effect of nanoparticles in the olfactory system as well as indirect effects or both could be responsible for the observed phenotypes. Indeed, neurodegenerative disorders have been associated with protein aggregate accumulation in the olfactory system [15, 52, 56, 57] and modification of the number of olfactory dopaminergic neurons in the OB [58–60], but have also been linked to alterations in the cholinergic, noradrenergic, and serotonergic neuromodulatory systems innervating olfactory structures [49, 55, 61].

Animal research has confirmed and expanded the observed findings in humans, and has shown that the fetal stage is a critical period of vulnerability. Nevertheless, the effects on the CNS of a gestational exposure to air pollution at such a critical period for its anatomic and functional development remain questioned and have been poorly investigated in controlled conditions mimicking indirect human exposure and in early postnatal stages [39–43]. Moreover, how the neuroanatomical continuum between brain and olfactory tissues is impacted by DE exposure remains largely unknown.

To investigate these aspects, we took advantage of a rabbit model recently developed to analyse the toxicity of repeated in utero DE exposure on the foetoplacental development, and we used a controlled inhalation system delivering a polluted air enriched in NP of small size (< 500 nm) and with a low concentration of non-inert gases [62]. The rabbit was used because of its hemodichorial placentation which is anatomically and functionally closer to that in humans than that in rodents [36, 37, 62, 63]. Based on this controlled nose-only inhalation study, previous studies have demonstrated that the fetoplacental development is disturbed by maternal exposure to DE, with translocation of nanoparticle-like structures, most probably originating from the diesel exhaust, from the dams to the fetal systemic circulation across placenta [62, 64]. We investigated the olfactory system as a peripheral highly vascularized tissue at the interface between the maternal environment and the brain, as well as an indicator of disturbances in higher integrative brain structures. Our hypothesis was that the maternal inhaled DE could reach the fetal olfactory pathway, either through the hematogenic pathway or through the OM (in contact with the amniotic fluid), then the OB (throughout nerve bundles), thus resulting in brain penetration of nanoparticles with potential early neurotoxic effects. To better characterize events of predisposition to neurodevelopmental disorders, investigations focused on the early stages of development.

Results

Transmission Electron microscopy (TEM) analysis

Structural and ultrastructural changes in the OM

Observations were made at different levels of the OM, from the apical part of the epithelium in contact with the mucus to the axon fascicles under the *lamina propria* (Fig. 1). OM of control fetuses exhibited a normal general morphology, with a pseudo-stratified columnar organization, a dense submucosal layer with blood vessels (Fig. 1a) and the presence of numerous organized nerve bundle sections (Fig. 1c). Even though exposed fetuses showed an OM of normal thickness, they exhibited relative disorganization of the epithelial cell layer, with several empty spaces visible at the basal level (Fig. 1b, see black arrows). The fasciculation of axons under the *lamina propria* was also impacted with axon bundle sections appearing usually less compact (Fig. 1d compared to Fig. 1c). The morphological alterations were noticed in all samples of exposed fetuses, but their severity was variable among zones.

At the ultrastructural level, despite comparable cilia density between exposed and control fetuses at the apical part of the OM, altered cell organelle density was observed in the dendritic endings of some exposed fetuses' olfactory sensory neurons (OSN) (Fig. 1f compared to 1e). Under the *lamina propria*, hypertrophy of

axons in the nerve bundle sections was noticed in all exposed fetuses (Fig. 1d compared to 1c). These alterations were confirmed at higher magnification (Fig. 1h, see white arrows). Chromatin was condensed and marginalized in the olfactory ensheathing cells (OEC), as shown by the presence of dense patches of chromatin at the periphery of the nucleus, which was not observed in control samples (Fig. 1h compared to 1g).

Structural and ultrastructural changes in the OB

TEM observations were performed on each of the three stratified zones of the OB (i.e., the glomerular, the mitral and the granule cell layers) (Fig. 2). When compared to controls, where no morphological changes were observed (Fig. 2a), exposed fetuses exhibited a decrease in the density of axonal endings associated with the presence of areas empty of biological material around glomeruli (Fig. 2b1 and Fig. 2d, see black stars). The periglomerular cells (PG) exhibited cellular hypertrophy, suggesting a "swelling" phenomenon, and their nuclei displayed condensation and marginalization of the chromatin (Fig. 2d, see white arrows). Moreover, the cyto-architecture of the granule cell (Gr) layer, which normally tends to be spatially organized in restricted and well-defined clusters of potentiated mitral-granule cell synapses [65, 66], was altered. Indeed, exposed fetuses showed a disruption of the Gr clusters (Fig. 2b3 and Fig. 2f), along with condensation and marginalization of the chromatin in Gr nuclei (Fig. 2f, see white arrows). No major neuroanatomical alteration in the mitral (Mt) cell layer of exposed fetuses was observed (Fig. 2b2 compared to Fig. 2a2).

Presence of NP-like particles in the olfactory tissues

To determine whether inhaled diesel nanoparticles were able to reach fetuses and alter olfactory tissues before birth, ultrathin sections of OM and OB, collected at gestational day 28 (GD28), were examined by TEM. Particle-like structures (15–20 nm in diameter) were observed in OM of fetuses from which the mothers were exposed to DE. When present, they were predominantly located in cilia (Fig. 3a) or in the cytoplasm of dendritic knobs (Fig. 3b) of OSN. Interestingly, in cilia, the particle-like structures were found as single, i.e. isolated, particles (Fig. 3b1, white arrows), whereas in the cytoplasm of dendritic knobs, they were concentrated into lysosome-like vesicles (Fig. 3a and 3a1, white arrows). Particle-like structures were not visualized in OEC or OSN axons of exposed fetuses (not shown). In the OB, smaller NP-like particles were observed in lysosome-like vesicles in the cytoplasm of PG cells of exposed fetuses (5 nm in diameter) (Fig. 3c). No particle-like structures were visualized in the other regions of interest or in all control fetuses.

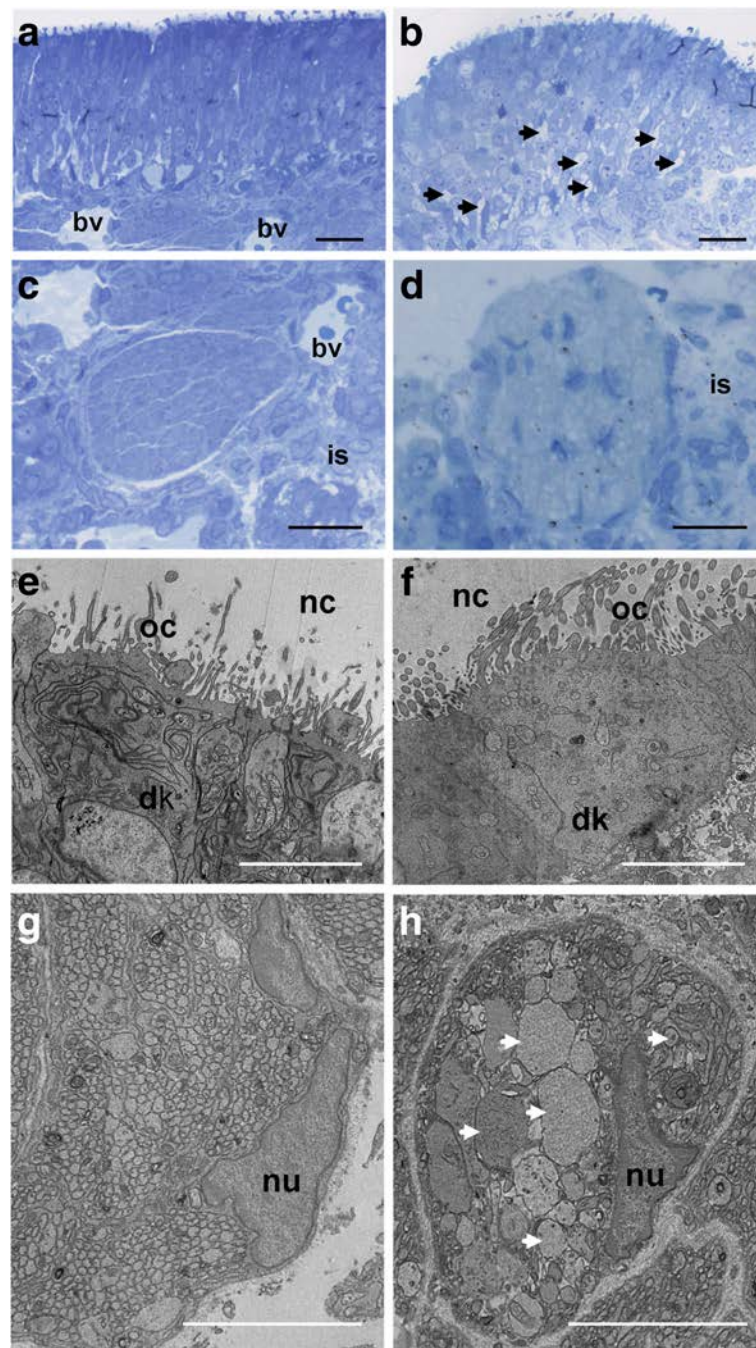


Fig. 1 Effects of DE exposure on the olfactory mucosa. **a** to **d**. Micrograph of an olfactory mucosa from control (**a**, **c**) and exposed (**b**, **d**) GD28 fetuses. The histological coloration reveals the anatomical alterations of the olfactory mucosa (**b**) and sub-mucosa (**d**) in exposed GD28 fetuses, compared to control GD28 fetuses (**a** and **c**, respectively). Scale bar = 25 μ m. **e** to **h**. Electron micrograph of dendritic knobs of an olfactory sensory neuron and of an olfactory axon bundle from control (**e** and **g**) or exposed (**f** and **h**) GD28 fetuses. Note the decrease of cell organelles in the dendrite knobs of the OSN in exposed GD28 fetuses (**f**), compared to control GD28 fetuses (**e**). The white arrows indicate axonal hypertrophy of the olfactory axons of exposed fetuses (**h**), not observed in control fetuses (**g**). Note the condensation and marginalization of the chromatin of the ensheathing cells of exposed fetuses when compared to controls. Scale bar = 5 μ m. bv = blood vessels; nc = nasal cavity; dk = dendritic knob; oc = olfactory cilia; nu = nucleus, is = intercellular space

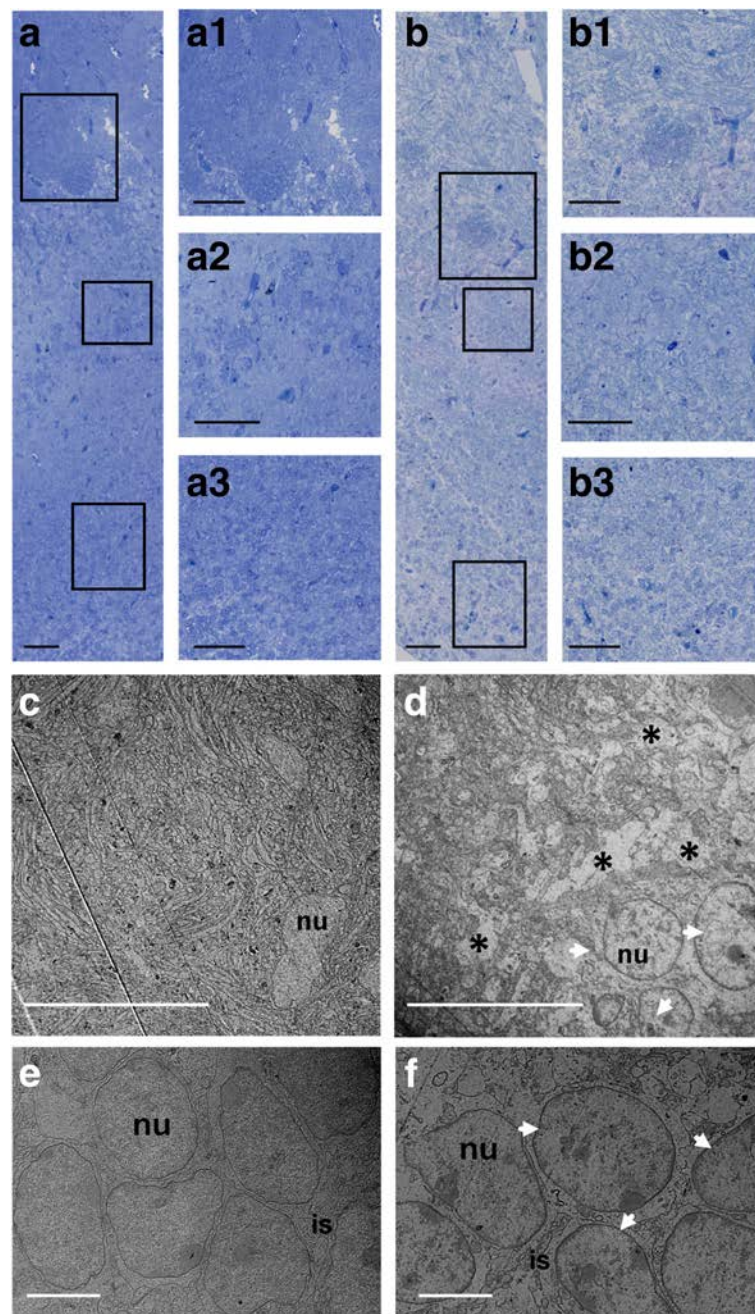


Fig. 2 Effects of DE exposure on the olfactory bulb. **a** and **b**. Micrograph of an olfactory bulb section from control (**a**) and exposed (**b**) GD28 fetuses. The histological coloration reveals the anatomical alterations of the different layers of the olfactory bulbs of exposed GD28 fetuses (**b**), compared to control ones (**a**) and the decrease in axonal ends and the presence of areas empty of biological material around glomeruli of exposed fetuses (**b** and **b1**) when compared to controls (**a** and **a1**). Granule cells clusters seem disrupted on exposed fetuses (**b3**) when compared to controls (**a3**). No anatomical differences in the mitral (Mt) cell layer of exposed fetuses (**b2**) and control (**a2**) fetuses were observed. Scale bar: 50 μ m. **c** and **d**. Electron micrograph of the glomerular layer of olfactory bulbs from control (**c**) and exposed (**d**) GD28 fetuses. Note a significant decrease in axonal endings and the presence of empty areas (black stars) around the glomerulus from exposed fetuses (**d**), compared to the glomerulus from control fetuses (**c**). The PG cells of exposed fetuses exhibit a hypertrophy and a condensation and marginalization of their chromatin (white arrows) compared to PG cells from control fetuses. Scale bar: 20 μ m. **e** and **f**. Electron micrograph of the granular layer of olfactory bulbs from control and exposed GD28 fetuses. Note the disruption of granular cells clusters, along with a condensation and marginalization of their chromatin, in exposed fetuses (**f**), compared to the granular clusters from control fetuses (**e**). Scale bar: 5 μ m. nu = nucleus, is = intercellular space

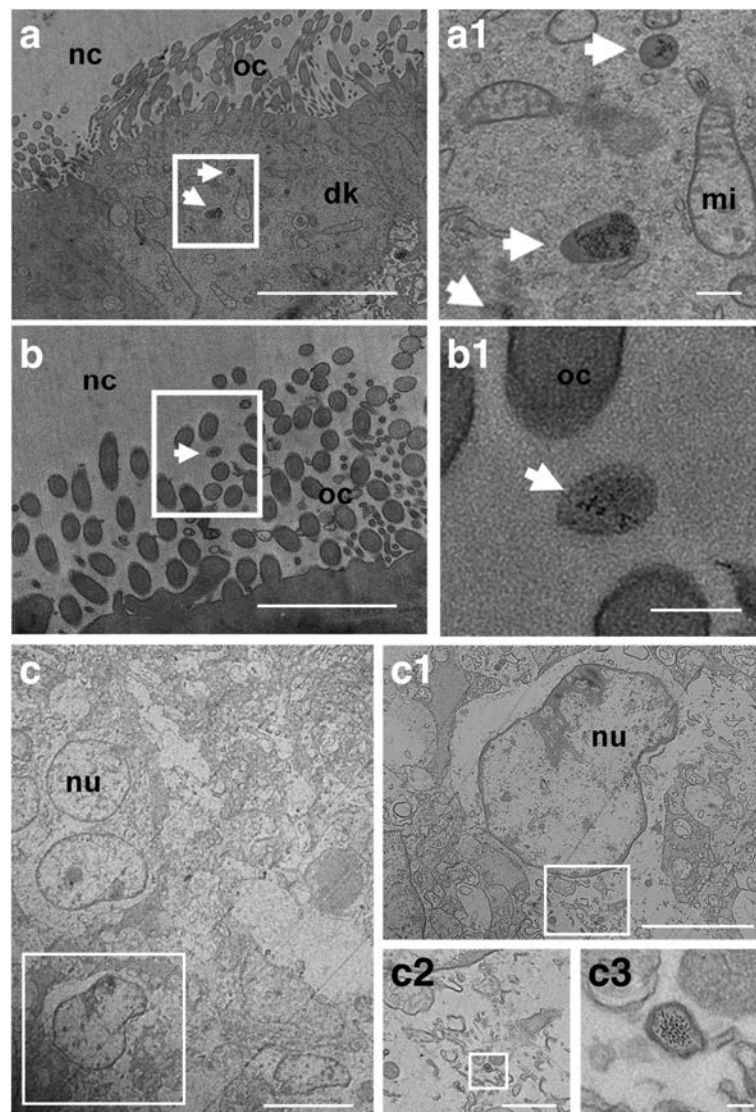


Fig. 3 Electron micrograph showing the presence of particle-like structures in exposed GD28 fetuses' olfactory tissues. **a** and **b**. Electron micrograph of the apical zone of the olfactory epithelium from exposed GD28 fetuses. **a**. Olfactory sensory neurons cilia with the structure in the framework enlarged at higher magnification (**a1**). The white arrows point out isolated particle-like structures (15–20 nm in diameter), which appeared inside olfactory cilia or in contact with olfactory cilia. **b**. Olfactory sensory neurons cytoplasm, with the structure in the white framework at higher magnification (**b1**). The white arrows point out lysosome-like vesicles containing NP-like particles (15–20 nm in diameter). Scale bars: **a** and **b** = 5 μ m; **a1** and **b1** = 200 nm. **c**. Electron micrograph of the olfactory glomerulus from an exposed fetus showing the presence of NP-like particles in the cytoplasm of a PG cell. **c1**, **c2** and **c3** are enlargements at higher magnification to point out lysosome-like vesicles containing NP-like particles (5 nm in diameter). Scale bars: **c** = 10 μ m; **c1** = 5 μ m; **c2** = 1 μ m; **c3** = 50 nm. nc = nasal cavity; dk = dendritic knob; oc = olfactory cilia; nu = nucleus, mi = mitochondrion

Histochemical analyses of olfactory pathways Monoaminergic content in the olfactory bulb

In order to highlight potential neurochemical alterations, the tissue contents of the biogenic monoamines serotonin (5-HT), dopamine (DA) and noradrenaline (NA) in the OB of control and exposed fetuses were analyzed. Concerning the serotonergic system, neither tryptophan (TRP) nor Kynurenine (K) levels were significantly different from controls (see Table 1). 5-HT levels were

decreased in exposed fetuses ($p = 0.023$); the 5-HT/TRP ratio of exposed fetuses was slightly lower than in controls, although not significant ($p = 0.09$). Concerning the 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels and 5-HIAA/5-HT ratio, no differences were observed between the two groups (Table 1).

For catecholamine levels, neither NA nor its main metabolite 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) were significantly changed when compared to controls.

Table 1 Effects of DE exposure on the serotonergic pathway of GD28 fetuses

	Control		Exposed		Effects of DE exposure		Effects of Sex		Exposure × Sex	
	Male (n = 4)	Female (n = 4)	Male (n = 4)	Female (n = 4)	F (1,15)	p-value	F (1,15)	p-value	F (1,15)	p-value
Trp (fmol/mg)	77,941 ± 4357.6	77,737 ± 9898.7	66,086 ± 7164.3	79,000 ± 7635.3	0.139	0.716	0.983	0.343	0.582	0.462
K (fmol/mg)	14,844 ± 689.1	13,875 ± 1144.6	12,028 ± 1334.5	12,611 ± 1312.6	0.669	0.431	0.000	0.995	0.049	0.829
5-HT (fmol/mg)	1718 ± 228.3	1546 ± 151.4	1081 ± 158.8	1187 ± 133.4	6.972	0.023*	0.046	0.833	0.724	0.413
5-HT/Trp	0.022 ± 0.004	0.020 ± 0.001	0.017 ± 0.003	0.015 ± 0.002	3.457	0.090	0.628	0.445	0.081	0.782
5-HIAA (fmol/mg)	170.0 ± 39.16	163.8 ± 32.29	197.9 ± 73.28	156.4 ± 18.62	0.244	0.631	0.199	0.664	0.136	0.720
5-HIAA/5-HT	0.098 ± 0.016	0.117 ± 0.011	0.184 ± 0.056	0.136 ± 0.023	0.822	0.384	0.455	0.514	0.638	0.441

Basal rates of Tryptophan (Trp), Kynurenine (K), Serotonin (5-HT) and 5-Hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), along with the correspondent ratios. Results were expressed as femtomoles/milligram of fresh tissues (fmol/mg). Results are shown as mean ± SEM. * $p < 0.05$ represented a significant difference between each group. 5-HT levels were decreased in exposed fetuses compared to controls. No significant difference existed between groups regarding the other variables of interest

However, the MHPG/NA ratio in exposed fetuses was higher when compared to controls ($p = 0.027$) (Table 2). Interestingly, the latter ratio revealed a sex-dependent difference between the two groups ($p = 0.04$) with no interaction between sex and DEP exposure ($p = 0.289$).

Concerning the dopaminergic pathway, DA levels tended to be higher in exposed fetuses ($p = 0.088$). Neither the levels of its metabolites (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC and Homovanillic acid, HVA), nor the ratios (HVA/DA and DOPAC/DA) or DA turnover were significantly affected by the gestational exposure (Table 2).

Bulbar intrinsic DA-cell subpopulations

In order to establish a link between the anatomical and the neurochemical disturbances of the olfactory system observed at GD28, the intrinsic DA-cells subpopulation within the glomerular cell layer was analyzed through the quantification of the Tyrosine Hydroxylase (TH)-specific labeled cells.

There was no significant differences in the number of TH⁺ cells in the fetal OBs between the two groups [means = $(7.12 \pm 0.97) \times 10^{-5}$ vs. $(7.48 \pm 1.40) \times 10^{-5}$ cells / surface unit (a.u) in controls and exposed, respectively; $p = 0.79$] (Table 3). This result was confirmed with another quantitative estimation using immunofluorescence analysis; the latter study showed no difference in the number of TH⁺-cells, DAPI⁺-cells or TH⁺-cell /DAPI⁺-cell ratio between the two groups (data not shown).

TH immunochemistry and acetylcholinesterase activity

Intensity of TH-staining, along with measurements of Acetylcholinesterase (AChE) activity were measured in glomerular cells of the OB in order to analyze the effect of DE exposure on the neuromodulatory inputs to the OB (Fig. 4). TH analysis did not show any significant difference between the two groups ($p = 0.143$) (Fig. 4a). The statistical analysis of AChE activity (Fig. 4b) did not reveal any significant effect of DEP exposure ($p = 0.942$). However, we observed a sex-dependent difference between the two groups ($p = 0.013$), and an interaction between fetus

sex and maternal DEP exposure ($p = 0.033$) (Table 4). This result, thus, highlights a sex-dependent vulnerability upon DEP exposure, with males presenting a decrease and females presenting an increase of AChE activity.

Olfactory-guided behavior is disturbed by DEP exposure at PND2

In order to highlight a possible connection between the anatomical and the neurochemical disturbances observed in GD28 and putative early olfactory behavioral alterations, a 2MB2 odor-guided behavior test was run in PND2 pups born to exposed or non-exposed dams.

Pearson's Chi-square analysis indicated that the observed percentage of positive responses to 2MB2 in control pups (66%) was not significantly different from previous reports [67] (Pearson's Chi-square, $df = 0.5269$; $p = 0.4679$) (Fig. 5, 60% of expected positive response, dotted line), but it was significantly lower in exposed pups (41%) (Pearson's Chi-square, $df = 9.1667$; $p = 0.0025$). Interestingly, the percentage of positive responses to 2MB2 in exposed pups was significantly lower than in control pups (Pearson's Chi-square, $df = 7.032$; $p = 0.008$) (Fig. 5).

Discussion

Using the animal model of controlled nose-only inhalation developed to analyze feto-placental development [62], we have shown that maternal exposure to DE throughout gestation leads to an accumulation of particle-like structures in fetal olfactory tissues, which appears to be associated with alterations in the neuroanatomical organization of this system. Moreover, such DE exposure affects monoaminergic neurotransmission in the OB and the olfactory-based behaviors connected with nutrient intake at birth. To our knowledge, this is the first study assessing the neuroanatomical nose-brain continuum around birth, even though a direct link between the anatomical and neurochemical disturbances of the olfactory system observed at the fetal stage and the behavioral alterations registered in postnatal early life remains to be demonstrated. These data confirm and expand previous results

Table 2 Effects of DE exposure on the catecholamine system of GD28 fetuses

	Control		Exposed		Effects of DE exposure		Effects of Sex		Exposure × Sex	
	Male (n = 4)	Female (n = 4)	Male (n = 4)	Female (n = 4)	F (1,15)	p-value	F (1,15)	p-value	F (1,15)	p-value
DA (fmol/mg)	274.9 ± 27.59	276.1 ± 37.85	389.7 ± 45.00	341.9 ± 41.79	3.502	0.088	0.525	0.484	0.262	0.619
DOPAC (fmol/mg)	212.1 ± 56.13	212.1 ± 43.34	346.0 ± 122.38	460.3 ± 84.89	2.451	0.146	0.453	0.515	1.308	0.277
HVA (fmol/mg)	222.6 ± 32.11	280.4 ± 32.21	514.1 ± 71.17	412.0 ± 134.76	2.761	0.125	0.357	0.562	0.311	0.588
DOPAC/DA	0.789 ± 0.240	0.789 ± 0.147	0.857 ± 0.247	1.33 ± 0.104	0.738	0.409	1.644	0.226	0.612	0.115
HVA/DA	0.810 ± 0.084	1.066 ± 0.214	1.315 ± 0.068	1.158 ± 0.247	0.411	0.534	0.016	0.901	0.612	0.451
(DOPAC+HVA)/DA	1.599 ± 0.290	1.855 ± 0.303	2.173 ± 0.307	2.488 ± 0.348	0.854	0.375	0.879	0.369	0.557	0.471
NA (fmol/mg)	414.7 ± 14.90	488.8 ± 45.88	304.0 ± 54.32	437.1 ± 145.76	1.945	0.191	1.808	0.206	0.431	0.525
MHPG (fmol/mg)	126.9 ± 17.15	94.45 ± 24.17	135.0 ± 31.76	137.9 ± 78.42	0.613	0.450	0.099	0.759	0.071	0.794
MHPG/NA	0.304 ± 0.36	0.192 ± 0.039	0.469 ± 0.102	0.277 ± 0.091	6.466	0.027*	5.416	0.040*	1.241	0.289

Basal rates of Dopamine (DA), 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), Homovanillic acid (HVA), Noradrenalin (NA), and 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), along with the correspondent ratios. Results were expressed as femtomoles/milligram of fresh tissues (fmol/mg). Results are shown as mean ± SEM. * $p < 0.05$ represented a significant difference between each group. Neither NA, nor its main metabolite MHPG, was significantly changed when compared to controls. However, the MHPG/NA ratio in exposed fetuses was higher when compared to controls. DA levels were slightly higher in exposed fetuses, even if not significant. No significant difference existed between groups regarding the other variables of interest

suggesting that UFPs are of great concern given their particular characteristics (i.e. size, surface charge, surface coating, chemical composition,...), which have been argued to determine their capacity to access organs and exert tissue alterations [68–73]. They thus are suspected to represent a class of particles with serious health effects compared to PM₁₀ and PM_{2.5} [74, 75], and for which strong epidemiological evidence is not available yet due to the lack of exposure data [76]. Although we used a polluted air enriched in nanosized particles, we cannot exclude that the observed effects are also linked to the presence of other chemical components, known to be associated to neurodevelopmental deficits in several cases of gestational exposition [77, 78]. The inhalation model of exposure was monitored for volatile compounds including carbon monoxide and nitric oxide products with levels of 7 and 36 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively. Such values were largely under the levels used for traffic regulation in urban areas, suggesting the observed effects on olfactory system to be more related to NP exposure than to gaseous components. DE is composed of hundred chemical substances including among them Polycyclic Aromatic Hydrocarbons which have been demonstrated to be neurotoxic [79]. Whereas PAHs may contribute for a part to the effects observed here, it was not possible in the present study to measure their levels of concentration in the brain and the olfactory bulb.

Gestational inhaled diesel engine exhaust can reach fetal olfactory structures

We have demonstrated the presence of NP-like structures in various regions of the fetal olfactory system, from the periphery to the central OB structures, whose diameters were estimated between 5 and 20 nm depending on the structure (mean diameter of inhaled particles during exposure was 69 nm). To our knowledge, the current results demonstrate for the first time a possible nasal route of fetal exposure after maternal nose-only inhalation of DE in controlled conditions mimicking the fetal exposure encountered by humans in everyday life. So far, most studies describing particles in olfactory tissues have been performed in conditions of sustained exposure to non-controlled air pollutants, either in a chronic or acute highly concentrated environment in rodents [80, 81], dogs [13] or human [15]. However, it was not formally confirmed that these particles originated from the diesel exposure, since further analyses to determine the chemical composition of these NP-like structures are hindered by the important carbon content of DE. Moreover, so far, it has not been possible to study the chemical composition of their corona, although it could provide insight into mechanisms by which these particles access biological tissues [82, 83].

Even if it was not demonstrated how the inhaled particles can translocate to the fetal olfactory system, it is quite likely that the NP could have been transported to

Table 3 Quantification of TH-labeled cell number in GD28 olfactory bulbs

	Control		Exposed		Effects of DE exposure		Effects of Sex		Exposure × Sex	
	Male (n = 4)	Female (n = 4)	Male (n = 8)	Female (n = 5)	F (1,20)	p-value	F (1,20)	p-value	F (1,20)	p-value
TH-labeled cell (10 × 5 cells / surface unit, a.u)	7.99 ± 1.49	6.25 ± 1.48	6.57 ± 1.91	8.94 ± 2.41	0.074	0.790	0.020	0.888	1.013	0.329

Quantification of the number of TH+ labeled cells in control and exposed samples. * $p < 0.05$. No significant difference existed between groups

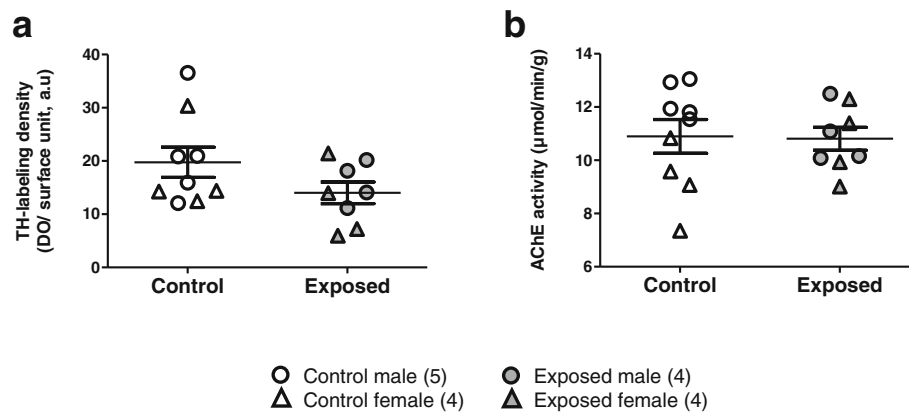


Fig. 4 Quantification of dopaminergic and cholinergic inputs into GD28 olfactory tubercle. **a** Relative mean density of TH+ labeled fibers in the olfactory tubercle. The quantitative estimation did not show any significant difference between the two groups. **b** Relative means density of AChE activity in the olfactory tubercle. There was no significant difference between the two groups regarding the DE exposure. However, we observed a sex-dependent difference between the two groups, which interacted significantly with DE exposure

the fetal olfactory organs through the systemic circulation since Valentino and colleagues have shown, on the same animals, that NPs were able to cross the maternal lung barrier and reach fetal erythrocytes across the placenta [62, 64]. Another possibility to explain the presence of NP-like particles at the level of the olfactory cilia bathing the nasal mucus is a direct translocation of NP from the amniotic fluid. It would be interesting to confirm the presence of NP in the amniotic liquid of exposed dams, as observed for tobacco substances in pregnant smoking women [84], in order to have an insight on the mechanisms by which fetuses are exposed to the particles, all mechanisms not being exclusive.

Interestingly, even if we observed free NP-like structures in the olfactory cilia, most were concentrated in lysosome-like vesicles throughout the olfactory structures. Such vesicles were not observed in the placenta of exposed rabbits, suggesting that the process might be specific to olfactory structures [62]. Whether they are associated with cell-specific uptake mechanisms such as lysosomal deposition or caveolae remains to be characterized. As UFPs have already been observed in caveolae of endothelial cells and in luminal red blood cells in myocardial capillaries of 1-year-old dogs from highly polluted cities [85], our observations also fit with an ongoing

hypothesis of transportation of inhaled NPs through a process called “transcytosis” [82].

A controlled repeated gestational exposure to DE alters the bulbar neuromodulation in exposed fetuses

We observed disturbances in the nerve fascicles arising from the olfactory epithelium, along with a decrease in axonal density and in cellular components around glomeruli in exposed fetuses. Such structural alterations are unlikely to be the consequence of a peripheral perturbation in the number and/or guidance of OSN projections to the OB, since no modification in the density of olfactory cells was observed in the OM. Interestingly, the observed heterogeneous hypertrophy of OSN axons was reminiscent of a “swelling” phenomenon, suggesting the onset of inflammatory processes of the cells, that has been shown in other neuronal cells following gestational DE exposure [37, 39]. Furthermore, we noticed evidence of ultrastructural modifications of nuclei in various olfactory cell types, suggesting early signs of cell death in OM and OB. Altogether, these observations suggest that DE impact the cellular homeostasis in olfactory structures at a timing encompassing an important window of developmental neurogenesis and could, thus, interfere with fetal neurobiological development.

Table 4 Quantification of dopaminergic and cholinergic inputs in GD28 olfactory tubercles

	Control		Exposed		Effects of DE exposure		Effects of Sex		Exposure × Sex	
	Male (n = 4)	Female (n = 4)	Male (n = 8)	Female (n = 5)	F (1,16)	p-value	F (1,16)	p-value	F (1,16)	p-value
TH-labeling density (DO/surface unit, a.u.)	21.27 ± 4.65	17.86 ± 4.84	15.89 ± 2.34	12.14 ± 4.11	2.461	0.143	1.080	0.319	0.001	0.980
AChE activity (μmol/min/g)	12.25 ± 0.34	9.21 ± 0.83	10.96 ± 0.85	10.66 ± 0.85	0.006	0.942	8.462	0.013*	5.773	0.033*

Relative mean density of TH+ labeled fibers in the olfactory tubercle. The quantitative estimation did not show any significant difference between the two groups. Relative mean density of AChE activity in the olfactory tubercle. There is no significant difference between the two groups regarding the DE exposure. However, we observed a sex-dependent difference between the two groups, which interacted significantly with DEP exposure. * $p < 0.05$



Fig. 5 Percentages of positive behavioral responses following to the presentation of the rabbit mammary pheromone 2MB2. Results are expressed as mean $\pm$ SEM for each group. # $p < 0.01$ represented a significant difference between the groups and the expected percentage (60%). The percentage of positive responses in exposed fetuses (41%) was significantly lower, whereas that of control fetuses (66%) was not significantly different. ** $p < 0.01$ represented a significant difference between the two groups. The comparison of the percentages showed a significant difference between the two groups

Associated with these ultrastructural alterations, we observed bulbar neuromodulatory disturbances, with a decrease in 5-HT levels and an increase in NA turnover in the OB of exposed fetuses. Moreover, a sex-dependent alteration in cholinergic inputs to the OB was shown. Furthermore, although neither bulbar intrinsic DA-cell subpopulations nor dopaminergic projection inputs to the OB seemed to be affected by DE exposure, a tendency of increase in bulbar DA levels was observed.

Our data thus suggest that alterations of the centrifugal olfactory input precede a bulbar dopamine disturbance, which is not inconsistent with an ongoing hypothesis suggesting that the bulbar dopaminergic alterations are a compensatory plastic response following reduced neuromodulatory innervations [60].

Given that the noradrenergic, serotonergic, dopaminergic and cholinergic projections originate from central structures, the neurochemical alterations might not only concern olfactory processes, but also more integrative ones. Such early perturbations on fetal neural network might also persist later in life and lead to neurocognitive disorders related to monoaminergic systems [41–45, 86]. Further analyses need to be performed in order to see if and how DE exposure alters the modulatory pathways in other brain regions and, therefore, to further substantiate the toxic effects of DE inhalation on the CNS.

Interestingly, sex-dependent neurochemical disturbances in the OB and Tu of exposed fetuses were observed. Such a possible link between gestational air pollution exposure and sex-dependent alterations of the CNS has already been pointed out in recent studies, with males being often more affected by environmental insults than females [34, 47, 48, 87]. However, to our knowledge, this is one of the rare studies comparing

monoamine fetal disturbances between sexes. Indeed, most studies have been performed on in utero exposed male adult mice only to show imbalances in the monoaminergic systems related to various neurocognitive disorders [41–44]. Moreover, behavioral evaluations on both male and female mice have shown that prenatal exposure to UFPM induces more severe consequences on males [88]. Furthermore, male offspring prenatally exposed to both airborne pollution and maternal stress during late gestation were cognitively impaired, suggesting that males could be more sensitive to the adverse CNS changes after DE exposure [34]. Nevertheless, the PM-induced sex-dependent CNS changes are quite complex [88] and require further investigation.

Overall, our data suggest that early life exposure to airborne pollution may affect the fetal brain development and might predispose the progeny to neurodevelopmental diseases later in life, which is in agreement with the recent work of Calderon-Garcidueñas and colleagues in children and young adults [89].

A controlled repeated gestational exposure to DE leads to disturbance in odor sensitivity in rabbit offspring

The behavioral performance of rabbit neonates clearly revealed early olfactory behavioral alterations at birth following a repeated gestational exposure to DE. Rabbit newborns, for that matter, constitute an interesting model system given that they display innate behaviors mainly governed by olfactory cues to feed at this stage, through the stereotyped behavioral pattern in response to the rabbit mammary pheromone 2-Methyl-3-butyn-2-ol [90, 91] through the main olfactory system. In utero DE exposed pups exhibited a decreased response to 2MB2, tested at a single commonly used concentration [90]. Since the

newborn response to the mammary pheromone follows a concentration-dependent bell-shaped curve, with an optimal responsiveness between 10^{-8} and 10^{-6} g/ml [67], the low response at $5 \cdot 10^{-8}$ mg/ml could be due to a shift of the bell-shaped curve response to lower or higher concentrations, thus indicating either a worsened or a better olfactory threshold in exposed animals. However, the morphological and neurochemical alterations observed at GD28 in the main olfactory system favors an impairment of the neurobehavioral development of newborns, even though a direct link between the anatomical and functional disturbances of the olfactory system observed in GD28 and the behavioral alterations registered at PND2 remains to be demonstrated [90, 92]. Moreover, it is possible that the structural and neurochemical alterations not only concern olfactory processes, but also more integrative ones, since gestational exposure to DE was demonstrated to induce various neurocognitive disorders related to monoaminergic systems [41–45, 86]. In fact, because of the known anatomical and functional continuum between the olfactory system and the rest of the brain, there could be olfactory transport of toxic materials, including particulate matter, into various regions of the brain connected with several aspects of other motivated behaviors [15, 93, 94]. Besides, no difference in the growth of pups was observed until weaning (Charlier M. and Rousseau D., unpublished data) suggesting that exposed pups have an efficient suckling behavior, despite the modification in 2MB2 pheromone response (not shown).

Conclusion

The present study describes the neurodevelopmental toxic effects on the olfactory system of a controlled daily gestational exposure to DE on a human hemodichorial placentation animal model in conditions mimicking urban human exposure. Overall, our findings strongly suggest that prenatal exposure to DE in rabbit fetuses allows translocation of nanoparticles towards fetal nervous system structures with potential pathological effects on the nervous system. Such exposure affects the neuro-olfactory development of rabbit offspring, and alters early olfactory-based behaviors. Because of the known anatomical and functional continuum between the olfactory system and the rest of the brain, such early alterations could be indicative of disturbances in higher integrative structures. These data confirmed that prenatal phase should be considered as an important window for brain development, during which there is an elevated susceptibility to environmental insults [24, 78, 95]. Preventing exposure of pregnant women to a polluted environment should, therefore, be taken into account by public authorities.

Methods

Animal exposure

The present study is part of a larger program funded by the ANR (ANR-13-CESA-0011-EPAPP). The experimental procedure for animal exposure has been previously detailed and approved by the French ethical committee N°45 under the number N°12/102 [62]. Briefly, twenty-eight pregnant New-Zealand white female rabbits (INRA1077 line, 1-year old) (F0) were exposed by nose-only inhalation to either clean air (control group; $N = 14$) or diluted DE (1 mg/m^3) (exposed group; $N = 14$) for 2 h/day, 5 days/week, from gestational day 3 (GD3) to day 27 (i.e., 20 days over a 31-day gestation) (Fig. 6, adapted from [62]).

DE exposure was performed with the Mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory [96], connected to a 25KVA Loxam engine, with a 500 nm particle filter. The measured components of the DE exposure mixture used in the present experiment were analyzed elsewhere and their NP content displayed an average size of 69 nm [62].

Experimental procedure

At GD28, 12 dams ($N = 5$ controls; $N = 7$ exposed) were euthanized and their fetuses counted, weighed individually and euthanized by decapitation. Skilled staff using well-maintained equipment ensured the rapid death of each animal and carried out the manipulation under appropriate conditions. All experiments were performed by confirmed experimenters or with their help. F1 fetuses were sexed by visual observation of their internal genital organs (confirmed by a second sexing by qPCR approach). Fetal olfactory mucosa (OM), hemi-olfactory bulbs (OB) and whole brains were dissected and nervous tissues were weighed. We observed no difference in total brain or OB weight between exposed and not exposed fetuses (not shown). Random samples of the latter structures were snap frozen in liquid nitrogen or isopentane for subsequent anatomical and chemical measures. Non-frozen OB and OM were randomly assigned to histological, immunological or transmission electron microscopy (TEM) experiments.

Eighteen exposed or control dams ($N = 9$ in each group) gave birth to F1 offspring. The day of birth was settled as postnatal day 0 (PND0). At PND2, offspring were examined for their odor-guided behavior in response to the presentation of the rabbit mammary pheromone 2-Methyl-3-butyn-2-ol (2MB2) as published elsewhere [90]. They were then raised in control conditions in order to study long-term and intergenerational effects of this gestational DE exposure (as described previously [62]).

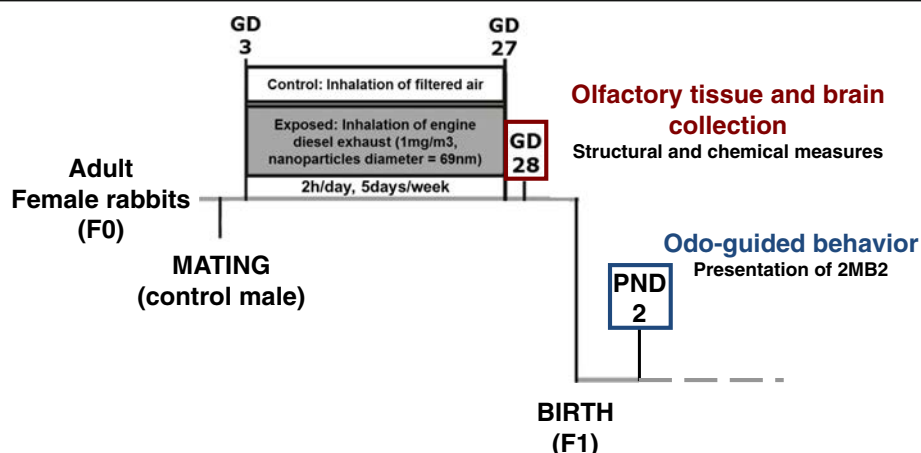


Fig. 6 Experimental protocol. Pregnant New-Zealand white female rabbits were exposed by nose-only inhalation to either clean air (control group; $N = 14$) or DE containing diluted DEP (1 mg/m^3) (exposed group; $N = 14$) for 2 h/day, 5 days/week, from gestational day 3 (GD3) to day 27. At GD28, 12 dams ($N = 5$ controls; $N = 7$ exposed) were euthanized and their fetuses sacrificed by decapitation. Fetal olfactory mucosa (OM), hemi-olfactory bulbs (OB) and whole brains were dissected. Random samples of the latter structures were chosen for structural and chemical measures. Eighteen exposed or control dams ($N = 9$ each) gave birth to F1 offspring. The day of birth was settled as postnatal day 0 (PND0). At PND2, offspring were examined for their odor-guided behavior in response to the presentation of the rabbit mammary pheromone 2-Methyl-3-butyn-2-ol (2MB2). They were then raised in control conditions in order to study long-term and intergenerational effects of this gestational DE exposure.

Olfactory system measurements

TEM analysis of the olfactory system

Fetal OM and OB samples collected randomly from 2 exposed and 2 control dams (one male and one female per litter; $N = 4$ in each experimental group) were fixed in 2% glutaraldehyde overnight at 4°C . Samples were contrasted with 0.5% OTE (Oolong Tea extract) in cacodylate buffer (20 min, 37°C), fixed in 1% OsO_4 containing 1.5% ferrocyanide (20 min, 37°C), dehydrated using a series of ethanol dilutions (5 min each, 37°C) and acetone (10 min, 37°C) and embedded in Epon resin using a microwave (60 min, 50°C). Sections ($1 \mu\text{m}$) were stained with methylene Blue/Azure II and examined with an Olympus microscope. Ultrathin sections (75 nm) were stained with lead citrate and examined with HITACHI HT7700 transmission electron microscope at 80 KeV on MIMA2 platform (<https://www6.jouy.inra.fr/mima2>). For each sample, several blocks were cut ($N = 2$) and at least 4 grids/block were observed by a blind experimenter. Images were selected to show a representative view of the alterations in the olfactory tissues.

Bulbar HPLC dosage

The levels of DA, 5-HT, NA, and their respective metabolites were quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) on crushed OB samples. Prior to analysis, randomly chosen right OBs from control or exposed fetuses ($N = 4$ male and $N = 4$ female per group) were weighted, crushed in $400 \mu\text{L}$ of 0.2 M perchloric acid and centrifugated at $22,000 \text{ g}$ for 20 min at 4°C . The supernatants were collected and filtered through a 10 kDa

membrane (Nanosep, Pall) by centrifugation at 7000 g (30 min). Then, a $20 \mu\text{L}$ aliquot of each sample was analyzed for 5-HT and 5-HIAA by fluorometric detection (Kema). The amounts of catecholamines (DA and NA) and of their main metabolites (DOPAC and HVA for DA; MHPG for noradrenaline) were measured by electrochemical detection on a serial array of coulometric flow-through graphite electrodes (CoulArray, ESA). Analysis, data reduction, and peak identification were fully automated. Results were expressed as femtomoles/milligram of fresh tissues [97, 98]. Results are shown as mean $\pm$ SEM.

Bulbar tyrosine hydroxylase immunohistochemistry and image analysis

Randomly chosen fetal OBs ($N = 4$ male and $N = 4$ female control fetuses; $N = 8$ male and $N = 5$ female exposed fetuses) were fixed during 24 h in 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C and cryoprotected with a 30% sucrose solution in PBS for 3 days at 4°C . Tissues were thereafter embedded in tissue-TEK and store at -80°C .

Serial sections ($16 \mu\text{m}$) of GD28 OBs were mounted on Super Frost slides (Roth-Sochiel, Lauterbourg, France) and kept at -80°C until use. The slices were dried at room temperature for 20 min. The endogenous peroxidase activity was inhibited by H_2O_2 (0.3%) for 30 min. Sections were then blocked with 1% BSA and normal horse serum for 30 min and incubated overnight at 4°C in presence of mouse monoclonal primary anti-tyrosine hydroxylase antibody (TH, catalogue #T1299; Sigma, St. Louis, MO, 1:5000 in 0.3% Triton X-100). Samples were then incubated for 30 min at room temperature with biotinylated

anti-mouse IgG (Vectastain Elite ABC Kit, PK-6102, Vector laboratories, Burlingame, USA), followed by avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit, PK-6102, Vector laboratories, Burlingame, USA) that was used according to the supplier's instructions. The slices were revealed for 10 min using 3',3'-diaminobenzidine (DAB) substrate kit for visualization (SK-4100, Vector laboratories, Burlingame, USA), resulting in a gray-black reaction product. The reaction was stopped with deionised water. The sections were then dried and coverslipped with Eukitt mounting medium (catalogue #03989; Sigma, St. Louis, MO) and kept in the dark until image capture.

Stained sections were examined using a light upright optical microscope (Nikon Eclipse Ni-U) at 4x and 40x magnifications (Nikon France, Champigny-sur-Marne, France) and quantified using the NIS-Elements Br software (Nikon). A blind experimenter quantified all images.

Quantification of the number of TH-immunoreactive cells (TH⁺) was carried out by examination of 2 non-adjacent sections per fetus photographed with the 4x objective, on 4 independent immunohistochemistry experiments. After application of an optimal threshold ([30, 170]) to exclude the non-specific labeling and the background, the quantification of TH-immuno-labeled cells was fully automated. The number of TH⁺ cells was then normalized to the selected area (ROI) size. Two independent ROIs per section were analyzed (i.e., four measures per animal).

Brain histological and histochemical measurements

Tissue preparation

Randomly chosen fetal brains ($N = 5$ male and $N = 4$ female control fetuses; $N = 4$ male and $N = 4$ female exposed fetuses) were rapidly frozen in cooled isopentane at -34°C and subsequently stored at -80°C . Twenty μm -thick coronal sections were serially cut on a cryostat, collected on gelatin-chrome alum-coated slides and stored at -80°C until histological and histochemical processing.

Brain tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase immunohistochemistry and image analysis

Slices were dried at room temperature for 20 min. Sections were incubated in 4% formaldehyde for 30 min. The immunohistochemical protocol has been described above (5.3.3). Sections were incubated overnight at 4°C in presence of mouse monoclonal primary anti-tyrosine hydroxylase antibody (TH, catalogue #T1299; Sigma, St. Louis, MO, 1:5000 in 0.3% Triton X-100) or in presence of mouse monoclonal primary anti-tryptophan hydroxylase antibody (TrpH, catalogue #T0678; Sigma, St. Louis, MO, 1:2000 in 0.3% Triton X-100). The slices were revealed for 3 min using DAB substrate kit.

Analysis of TH and TrpH stained sections was carried out with a BIOCOTM computer-assisted image analysis

system (Les Ulis, France), in which optical density readings were performed. In absence of an available rabbit brain atlas, anatomical structures were defined according to the Paxinos and Watson stereotaxic atlas of the rat brain (6th edition, 2007). The total labeling was measured by taking the mean of two optical densities on the same slice and on two successive slices. The mean non-specific labeling (measured on a region without TH or TrpH labeling) was subtracted of the total labeling. The measures were carried out on the olfactory tubercle (Tu), a structure by which central neuromodulatory inputs enter the OB.

Histochemical measurement of acetylcholinesterase activity

Slides were incubated for 12 h in 180 mL of stock solution (see below) to which had been added 208 mg of S-acetylthiocholine iodide and 5.4 mg ethopropazine. The slides were rinsed with deionized water and developed for 10 min in 1% sodium sulfide in phosphate buffer 0.1 M at pH 7.5. They were then rinsed three times for 5 min each with deionized water and immersed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M for 30 min, and then rinsed with distilled water (3 times; 5 min each). Subsequently, slides were dehydrated in series of ethanol baths (50, 70, 96, 100%) for 3 min, and cleared with toluene twice for 5 min. Slides were then coverslipped with Eukitt mounting medium (catalogue #03989; Sigma, St. Louis, MO). The stock solution was a 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 which was made 4.0 mM with respect to copper sulphate and 16 mM with respect to glycine. This was done by adding 6.8 g of sodium acetate, 1.0 g of copper sulphate crystals, and 1.2 g of glycine to 1.0 L of water and lowering the pH to 5.0 with HCl.

Standards for specific acetylcholinesterase activity were prepared from whole brain homogenates of adult rabbits. Enzyme activity of brain homogenates was biochemically measured by spectrophotometry according to the protocol described by Ellman et al. and modified by Dumont et al. [99, 100]. Briefly, brain homogenate (pH = 8) was diluted with 5–5'-dithiobis-2-nitrobenzoate acid (DTNB, 0.01 M) and acetylthiocholine iodide (75 mM). The thio-choline, formed during hydrolysis of acetylthiocholine, rapidly reacts with DTNB to release a colored 5-thio-2-nitrobenzoate anion with maximum absorption at 412 nm. The specific enzymatic activity of acetylcholinesterase was calculated from the linear slope of the curve obtained and was $8.41 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ of tissue. Brain homogenate sections of variable thickness were used to cover the entire range of activity measured in the different brain structures. Under our experimental conditions, the staining intensity was highly correlated to the thickness of the standard sections (linear function with $r = 0.997$). Analysis of acetylcholinesterase stained sections was carried out with a BIOCOTM

computer-assisted image analysis system (Les Ulis, France), in which optical density readings were converted by means of standards into enzymatic activity values expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ of tissue. Anatomical structures were defined according to the Paxinos and Watson stereotaxic atlas of rat brain (6th edition, 2007). At least 3 optical density readings were taken of labeled regions to obtain a homogeneous evaluation.

Olfactory-guided behavior

The olfactory sensitivity of exposed or control pups was tested at PND2. 117 pups ($N = 62$ control; $N = 55$ exposed) born to 15 dams ($N = 8$ controls, $N = 7$ exposed) were examined for their odor-guided behavior in response to the presentation of 2MB2 (catalogue #136816; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) as previously described [90, 91]. To standardize the feeding status of newborn animals, the access of the mother to the nest was blocked at 5 pm the day before the experiment and pups were individually tested at 8 am. The test consisted on taking each pup in a gloved hand with nest material, with its head left free to move. When the pup reached a state of relative immobility, the extremity of a glass-stick (length $\times$ diameter: 15×0.3 cm) carrying the 2MB2 stimulus (final concentration of 5.10^{-8} g/ml in water, freshly prepared each day) was positioned 0.5 cm in front of its muzzle without contact with its skin or hair. The stimulus was presented for 10 s and individual scores (yes or no) were recorded. Pups were considered to positively respond when they displayed searching movements, consisting of vigorous horizontal and vertical scanning of the head, after maximal stretching of the neck toward the stimulus. Results were expressed as the percentage of pups displaying searching and oral grasping responses when exposed to the molecule (i.e., positive responses). The final concentration used here has been reported to induce 60% of positive responses in control animals [90].

Thereafter, pups were immediately put back in the nest. The whole litter was tested in less than 15 min and the mother was allowed access to the nest at the end of the experiment. The glass-sticks were rinsed twice with pure ethanol and distilled water, and then dried between each pup.

Statistical analysis

For each variable measured in the present study, a Levene test for homogeneity of variances was performed. Thus, given that homogeneity of variance was assumed for most of the variables, a general linear model (GLM) was used for statistical analysis, adjusting the litter as a confounding variable. A Pearson chi-square procedure was used to analyze the percentage of animals that responded to the mammary pheromone 2MB2, without

considering the litter or the sex, which was not checked at this step. Significance was set at $p < 0.05$, tendency at $p < 0.1$. All statistical analyses were carried out using SPSS 16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Abbreviations

2MB2: 2-Methyl-3-butyn-2-ol; 5-HIAA: 5-Hydroxyindoleacetic acid; 5-HT: Serotonin; AChE: Acetylcholinesterase; AD: Alzheimer's disease; CNS: Central nervous system; DA: Dopamine; DE: Diesel exhaust; DEP: Diesel exhaust particles; DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid; F1: First generation; GD: Gestational day; GLM: General linear model; Gr: Granule cells; HVA: Homovanillic acid; K: Kynurenine; MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol; NA: Noradrenaline; NP: Nanoparticles; OB: Olfactory bulb; OEC: Olfactory ensheathing cells; OM: Olfactory mucosa; OSN: Olfactory sensory neurons; PD: Parkinson's disease; PG: Periglomerular cells; PM: Particulate matter; PND: Postnatal day; RO: Selected area; TEM: Transmission Electron Microscopy; TH: Tyrosine Hydroxylase; TRP: Tryptophan; TrpH: Tryptophan Hydroxylase; UFP: Ultrafine particle matter

Acknowledgements

We thank the UCEA (Unité Commune d'Expérimentation Animale) for housing the rabbits and participating to the experiments. This work has benefited from the facilities and expertise of the INRA MIMA2 platform (<http://www6.jouy.inra.fr/mima2>) for transmission electron microscopy, with a special thank to C. Longin. We thank Professor S.N. Thornton for reviewing and correction of the paper. We also thank John Boere and Paul Fokkens from the RIVM for DE exposure, which was performed with the mobile Ambient Particle Concentrator Exposure Laboratory.

Funding

The production of exposed and control animals was supported by ANR grant ANR-13-CESA-0011-EPAPP (P. Chavatte-Palmer) and by ERC consolidator grant N°311765-E-DOHaD (PI, Rémy Slama). Scientific exploration was financed by the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of Anses (PNREST Anses, 2014/1/190) supervised by Henri Schroeder. The same program subcontracted to ADEME financially supported Estefanía Bernal-Melendez Ph.D.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this article (and its supplementary information files). The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on request.

Authors' contributions

CB, FC, ACT, MCL, PCP, DRR and HS contributed to the idea and design of the study. JA, CB, DD, MCL and MAP performed the dissection of olfactory and brain tissues after sexing of the fetuses and recovery of heads by JA, PCP, ACT and DRR. EBM performed electronic microscopy. JA supervised the interpretation of TEM images. JC performed the bulbar monoaminergic neurochemical analysis by HPLC. EBM, PB, DD and BO performed the immunohistochemistry experiments. CB and MCL were responsible for the supervision of behavioral characterization of pups at PND2, which was technically conducted with the help of DD and MAP. EBM and HS performed the statistical analyses. CB and EBM wrote the draft manuscript, which was critically read and approved by all authors.

Ethics approval

Animals were treated according to the ethical standards defined by the National Institute for Agronomic Research (INRA) for animal health and care with strict compliance with the EEC recommendations (no. 86/609) and the 2010/63/EU directive on the protection of animals used for scientific purposes. The local ethical committee (N°45 in the French National register) approved the experimentation under N°12/102.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Neurobiologie de l'Olfaction, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. ²CALBINOTOX, Université de Lorraine, EA7488 Vandœuvre-lès-Nancy, France. ³Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, Hôpital Lariboisière, Paris, France. ⁴UMR BDR, INRA, ENVA, Université Paris Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France. ⁵Center for Sustainability, Environment and Health, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Netherlands. ⁶Institute of Risk Assessment Sciences, Utrecht University, Utrecht, Netherlands.

Received: 24 July 2018 Accepted: 20 December 2018

Published online: 17 January 2019

References

- Ostro B, Broadwin R, Green S, Feng WY, Lipsett M. Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: results from CALFINE. *Environ Health Perspect*. 2006;114(1):29–33. <https://doi.org/10.1289/ehp.8335>.
- Falcon-Rodríguez CI, Osornio-Vargas AR, Sada-Ovalle I, Segura-Medina P. Aeroparticles, composition, and lung diseases. *Front Immunol*. 2016;7(JAN):1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>.
- Xing YF, Xu YH, Shi MH, Lian YX. The impact of PM2.5 on the human respiratory system. *J Thorac Dis*. 2016;8(1):E69–74. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19>.
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol*. 2005;2:1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-2-10>.
- Costa LG, Cole TB, Coburn J, Chang YC, Dao K, Roque P. Neurotoxins are in the air: convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain. *Biomed Res Int*. 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/736385>.
- Calderón-Garcidueñas L. Safety Evaluation — Environmental Air Pollution and Brain Damage. 2002;30(3):373–89.
- Hartz AMS, Bauer B, Block ML, Hong J-S, Miller DS. Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J*. 2008;22(8):2723–33. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106997>.
- Block ML, Calderón-garcidueñas L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *NIH Public Access*. 2010;32(9):506–16. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.009>.
- Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss SH, Genc K. The adverse effects of air pollution on the nervous system. *J Toxicol*. 2012;2012. <https://doi.org/10.1155/2012/782462>.
- Block ML, Elder A, Auten RL, et al. The outdoor air pollution and brain health workshop. *NIH Public Access*. 2013;33(5):972–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.014>.
- Cruts B, van Etten L, Törnqvist H, et al. Exposure to diesel exhaust induces changes in EEG in human volunteers. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5(1):4. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-4>.
- Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Curr Opin Pulm Med*. 2012;18(2):144–50. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32834f0e2a>.
- Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Ontiveros E, et al. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. *Brain Cogn*. 2008;68(2):117–27. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.04.008>.
- Fonken LK, Xu X, Weil ZM, et al. Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Mol Psychiatry*. 2011;16(10):987–95. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.76>.
- Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, Henríquez-Roldán C, et al. Urban air pollution: influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(1):91–102. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.02.117>.
- Power MC, Weisskopf MG, Alexeeff SE, Coull BA, Avron S, Schwartz J. Traffic-related air pollution and cognitive function in a cohort of older men. *Environ Health Perspect*. 2011;119(5):682–7. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002767>.
- Ranft U, Schikowski T, Sugiri D, Krümmann J, Krämer U. Long-term exposure to traffic-related particulate matter impairs cognitive function in the elderly. *Environ Res*. 2009;109(8):1004–11. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.08.003>.
- Calderón-Garcidueñas L, Reed W, Maronpot RR, et al. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol*. 2004;32(6):650–8. <https://doi.org/10.1080/01926230490520232>.
- Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, et al. Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology*. 2016;56:94–106. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.007>.
- Moulton PV, Yang W. Air pollution, oxidative stress, and alzheimer's disease. *J Environ Public Health*. 2012;2012(x). <https://doi.org/10.1155/2012/472751>.
- Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, Mora-Tiscareño A, Medina-Cortina H, Torres-Jardón R, Kavanaugh M. Early alzheimer's and parkinson's disease pathology in urban children: friend versus foe responses - it is time to face the evidence. *Biomed Res Int*. 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/161687>.
- Calderon-Garcidueñas L, Torres-Jardon R. The impact of Air pollutants on the brain. *JAMA Psychiatry*. 2015;59812:5–6. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.57.2>.
- Grandjean P, Barouki R, Bellinger DC, et al. Life-long implications of developmental exposure to environmental stressors: new perspectives. *Endocrinology*. 2015;156(10):3408–15. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1350>.
- Guxens M, Aguilera I, Ballester F, et al. Prenatal exposure to residential air pollution and infant mental development: modulation by antioxidants and detoxification factors. *Environ Health Perspect*. 2012;120(1):144–9. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103469>.
- Guxens M, Garcia-Esteban R, Giorgis-Allemand L, et al. Air pollution during pregnancy and childhood cognitive and psychomotor development: six european birth cohorts. *Epidemiology*. 2014;25(5):636–47. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000133>.
- Freire C, Ramos R, Puertas R, et al. Association of traffic-related air pollution with cognitive development in children. *J Epidemiol Community Heal*. 2010;64(3):223–8. <https://doi.org/10.1136/jech.2008.084574>.
- Becerra TA, Wilhelm M, Olsen J, Cockburn M, Ritz BR. Ambient air pollution and autism in Los Angeles county, California. *Environ Health*. 2013;121(3):380–6. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205827>.
- Calderón-Garcidueñas L, Leray E, Heydarpour P, Torres-Jardón R, Reis J. Air pollution, a rising environmental risk factor for cognition, neuroinflammation and neurodegeneration: the clinical impact on children and beyond. *Rev Neurol (Paris)*. 2016;172(1):69–80. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.008>.
- Harris MH, Gold DR, Rifas-Shiman SL, et al. Prenatal and childhood traffic-related air pollution exposure and childhood executive function and behavior. *Neurotoxicol Teratol*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.06.008>.
- Lanphear BP. The impact of toxins on the developing brain. *Annu Rev Public Health*. 2015;36(1):211–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114413>.
- Newman NC, Ryan P, LeMasters G, et al. Traffic-related Air Pollution exposure in the first year of life and behavioral scores at 7 years of age. *Environ Health Perspect*. 2013;121(6):731–6. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205555>.
- Siddique S, Banerjee M, Ray MR, Lahiri T. Attention-deficit hyperactivity disorder in children chronically exposed to high level of vehicular pollution. *Eur J Pediatr*. 2011;170(7):923–9. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1379-0>.
- Allen JL, Liu X, Pelkowski S, et al. Early postnatal exposure to ultrafine particulate matter Air Pollution: persistent Ventriculomegaly, neurochemical disruption, and glial activation preferentially in male mice. *Environ Health Perspect*. 2014;122(May):939–45. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307984>.
- Bolton JL, Huff NC, Smith SH, et al. Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environ Health Perspect*. 2013;121(9):1075–82. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306560>.
- Ema M, Naya M, Horimoto M, Kato H. Developmental toxicity of diesel exhaust: a review of studies in experimental animals. *Reprod Toxicol*. 2013;42:1–17. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.074>.
- Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, et al. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol*. 2015;56:118–40. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.015>.
- Sugamata M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. Maternal exposure to diesel exhaust leads to pathological similarity to autism in newborns. *J Heal Sci*. 2006;52(4):486–8. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.486>.

38. 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. <https://doi.org/10.1111/ejn.13028>.
39. Sugamata M, Ihara T, Takano H, Oshio S, Takeda K. Maternal diesel exhaust exposure damages newborn murine brains. *J Heal Sci*. 2006;52(1):82–4. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.82>.
40. Klocke C, Allen JL, Sobolewski M, et al. Neuropathological consequences of gestational exposure to concentrated ambient fine and ultrafine particles in the mouse. *Toxicol Sci*. 2017;156(2):492–508. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx010>.
41. Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda KK. Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *J Toxicol Sci*. 2013;38(1):13–23. <https://doi.org/10.2131/jts.38.13>.
42. Yokota S, Mizuo K, Moriya N, Oshio S, Sugawara I, Takeda K. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci Lett*. 2009;449(1):38–41. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.085>.
43. Yokota S, Oshio S, Takeda K. In utero exposure to diesel exhaust particles induces anxiogenic effects on male offspring via chronic activation of serotonergic neuron in dorsal raphe. *Nucleus*. 2016;41(5):583–93.
44. Suzuki T, Oshio S, Iwata M, et al. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7:7. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-7>.
45. 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;50:108–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.009>.
46. Hougaard KS, K A J, Nordly P, et al. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5:3. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-3>.
47. Bolton JL, Marinero S, Hassanzadeh T, et al. Gestational exposure to air pollution alters cortical volume, microglial morphology, and microglia-neuron interactions in a sex-specific manner. *Front Synaptic Neurosci*. 2017;9(MAY):1–16. <https://doi.org/10.3389/fnysyn.2017.00010>.
48. Bolton JL, Smith SH, Huff NC, et al. Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J*. 2012;26(11):4743–54. <https://doi.org/10.1096/fj.12-210989>.
49. Doty RL. Neurobiology of disease olfaction in Parkinson ' s disease and related disorders. *Neurobiol Dis*. 2012;46(3):527–52. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.026>.
50. Rey NL, Wesson DW, Brundin P. The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis*. 2018;109:226–48. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.013>.
51. Calderón-Garcidueñas L, Valencia-Salazar G, Rodríguez-Alcaraz A, et al. Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;24(2):132–8. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.2.4157>.
52. Levesque S, Surace MJ, McDonald J, Block ML. Air pollution and the brain: subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*. 2011;8:1–10. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-105>.
53. Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Part Fibre Toxicol*. 2006;3(13). <https://doi.org/10.1186/1743-8977-3-13>.
54. Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henríquez-Roldán C, et al. 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. *Toxicol Pathol*. 2008;36(2):289–310. <https://doi.org/10.1177/0192623307313011>.
55. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(6):329–39. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>.
56. Attems J, Lintner F, Jellinger KA. Olfactory involvement in aging and Alzheimer ' s disease: An autopsy study. 2005;7:149–57. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7208>.
57. Levesque S, Taetzsch T, Lull ME, et al. Diesel exhaust activates and primes microglia: Air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. *Environ Health Perspect*. 2011;119(8):1149–55. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002986>.
58. Huisman E, Hoogland P V. A 100% Increase of Dopaminergic Cells in the Olfactory Bulb May Explain Hyposmia in Parkinson ' s Disease. 2004;19(6): 145–148. <https://doi.org/10.1002/mds.10713>.
59. Huisman E, Uylings HBM, Hoogland P V. Gender-Related Changes in Increase of Dopaminergic Neurons in the Olfactory Bulb of Parkinson ' s Disease Patients. 2008;23(10):1407–1413. <https://doi.org/10.1002/mds.22009>.
60. Mundiñano IC, Caballero MC, Ordóñez C, et al. Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol*. 2011;122(1):61–74. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0830-2>.
61. Kovacs I. Cholinergic structures and neuropathologic alterations in the olfactory bulb of Alzheimer ' s disease brain samples. 1998:167–170. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00097-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00097-3).
62. Valentino SA, Tarrade A, Aioun J, et al. Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. *Part Fibre Toxicol*. 2016;1–14. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0151-7>.
63. Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Santos AN, Duranthon V. Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*. 2012;144(1):1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>.
64. Aioun J, Tarrade A, Valentino S, et al. Transplacental transfer of nanoparticles inhaled due to maternal exposure to filtered diesel engine exhaust during pregnancy in a rabbit model. *Placenta*. 2016. <https://doi.org/10.1021/jp803475g>.
65. Migliore M, Cavarretta F, Marasco A, Tulumello E, Hines ML, Shepherd GM. Synaptic clusters function as odor operators in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(27):8499–504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502513112>.
66. Willhite DC, Nguyen KT, Masurkar AV, Greer CA, Shepherd GM, Chen WR. Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(33):12592–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602032103>.
67. Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E, Perrier G. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*. 2003;424(6944):68–72. <https://doi.org/10.1038/nature01739>.
68. Blunk T, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Muller BW, Muller RH. Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1993;14(1):1382–87. <https://doi.org/10.1002/elps.11501401214>.
69. Gerlofs-Nijland ME, van Berlo D, Cassee FR, Schins RPF, Wang K, Campbell A. Effect of prolonged exposure to diesel engine exhaust on proinflammatory markers in different regions of the rat brain. *Part Fibre Toxicol*. 2010;7(1):12. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-12>.
70. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke BR, Mäder K, Müller RH. Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int J Pharm*. 2000;196(2):245–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00432-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00432-9).
71. Lück M, Paulke B-R, Schröder W, Blunk T, Müller RH. Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J Biomed Mater Res*. 1998;39(3):478–85. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980305\)39:3%3C478::AID-JBM19%3E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980305)39:3%3C478::AID-JBM19%3E3.0.CO;2-6).
72. Maher BA, Ahmed IAM, Karloukovski V, et al. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(39):10797–801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605941113>.
73. Miller MR, Raftis JB, Langrish JP, et al. Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease. *ACS Nano*. 2017;11(5):4542–52. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08551>.
74. Ibal-Mulli a, Wichmann HE, Kreyling W, Peters a. Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med*. 2002;15(2):189–201. <https://doi.org/10.1183/09031936.00198013>.
75. Nel A. Air Pollution – Related illness : Effects of Particles. *Science* (80-). 2005;308(5723):804–6. <https://doi.org/10.1126/science.1108752>.
76. World Health Organization. Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project. 2013:309. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2013/review-of-evidence-on-health-aspects-of-air-pollution-revihaap-project-final-technical-report>.
77. Levy RJ. Carbon monoxide pollution and neurodevelopment: a public health concern. *Neurotoxicol Teratol*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.03.001>.

78. Suades-González E, Gascon M, Guxens M, Sunyer J. Air Pollution and neuropsychological development: a review of the latest evidence. *Endocrinology*. 2015;(August):en20151403. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1403>
79. Schroeder H. Developmental brain and behavior toxicity of Air pollutants: a focus on the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2011;41(22):2026–47. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.495644>.
80. Elder A, Gelein R, Silva V, et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. 2006. <https://doi.org/10.1289/ehp.9030>.
81. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, PHM H, Verbruggen A, Nemery B. Passage of Intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *About Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(9):1665–8. <https://doi.org/10.1164/rccm.2101036>.
82. Hervé F, Ghinea N, Schermann J-M. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J*. 2008;10(3):455–72. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9055-2>.
83. Woodward N, Finch CE, Morgan TE. HHS Public Access. 2016;2(2):353–73. <https://doi.org/10.3934/envirosci.2015.2.353.Traffic-related>.
84. Machado JDB, Chatkin JM, Zimmer AR, Goulart APS, Thiesen FV. Cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in the amniotic fluid and fetal cord at birth and in the urine from pregnant smokers. *PLoS One*. 2014;9(12): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116293>.
85. González-Macié A, Reynoso-Robles R, Torres-Jardón R, Mukherjee PS, Calderón-Garcidueñas L. Combustion-derived nanoparticles in key brain target cells and organelles in young urbanites: culprit hidden in plain sight in Alzheimer's disease development. *J Alzheimers Dis*. 2017;59(1):189–208. <https://doi.org/10.3233/JAD-170012>.
86. 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;11(2):1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149737>.
87. Bolton JL, Auten RL, Bilbo SD. Prenatal air pollution exposure induces sexually dimorphic fetal programming of metabolic and neuroinflammatory outcomes in adult offspring. *Brain Behav Immun*. 2014;37:30–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.029>.
88. Allen JL, Liu X, Weston D, et al. Developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particulate matter air pollution in mice results in persistent and sex-dependent behavioral neurotoxicity and glial activation. *Toxicol Sci*. 2014;140(1):160–78. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu059>.
89. Calderón-Garcidueñas L, González-Macié A, Reynoso-Robles R, et al. Hallmarks of Alzheimer disease are evolving relentlessly in metropolitan Mexico City infants, children and young adults. APOE4 carriers have higher suicide risk and higher odds of reaching NFT stage V at ≤ 40 years of age. *Environ Res*. 2018;164(December 2017):475–87. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.03.023>.
90. Coureaud G, Langlois D, Sicard G, Schaal B. Newborn rabbit responsiveness to the mammary pheromone is concentration-dependent. *Chem Senses*. 2004;29(4):341–50. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh037>.
91. Coureaud G, Charra R, Datiche F, et al. A pheromone to behave, a pheromone to learn: the rabbit mammary pheromone. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural. Behav Physiol*. 2010;196(10):779–90. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0548-y>.
92. Charra R, Datiche F, Gigot V, Schaal B, Coureaud G. Pheromone-induced odor learning modifies Fos expression in the newborn rabbit brain. *Behav Brain Res*. 2013;237(1):129–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.017>.
93. Mascagni P, Consonni D, Bregante G, Chiappino G, Toffoletto F. Olfactory function in workers exposed to moderate airborne cadmium levels. *Neurotoxicology*. 2003;24(4–5):717–24. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00024-X).
94. Dorman DC, Struve MF, Gross EA, Wong BA, Howroyd PC. Sub-chronic inhalation of high concentrations of manganese sulfate induces lower airway pathology in rhesus monkeys. *Respir Res*. 2005;6:1–10. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-121>.
95. Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ Health Perspect*. 2005;113(9):1230–3. <https://doi.org/10.1289/ehp.7571>.
96. Freney EJ, Heal MR, Donovan RJ, et al. A single-particle characterization of a mobile versatile aerosol concentration enrichment system for exposure studies. *Part Fibre Toxicol*. 2006;3:1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-3-8>.
97. Gamache P, Ryan E, Svendsen C, Murayama K, Acworth IN. Simultaneous measurement of monoamines, metabolites and amino acids in brain tissue and microdialysis perfusates. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1993;614(2): 213–20. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80311-Q](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80311-Q).
98. Kema IP, Schellings AMJ, Hoppenbrouwers CJM, Rutgers HM, de Vries EGE, Muskiet FAJ. High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. *Clin Chim Acta*. 1993;221(1–2):143–58. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(93\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(93)90029-4).
99. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7(2):88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).
100. Dumont M, Lalonde R, Ghersi-Egea JF, 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. *J Neural Transm*. 2006;113(9):1225–41. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0373-6>.

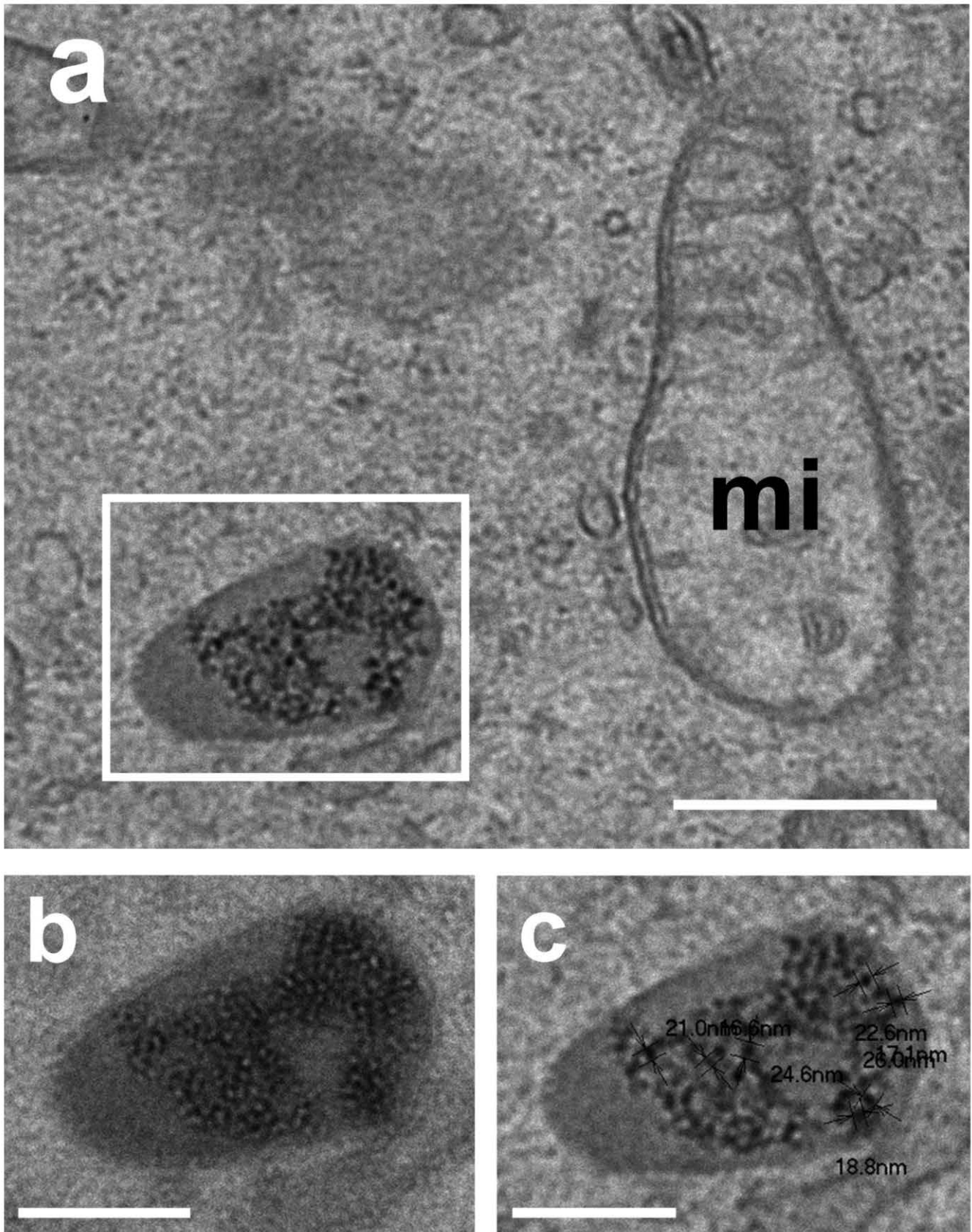
Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

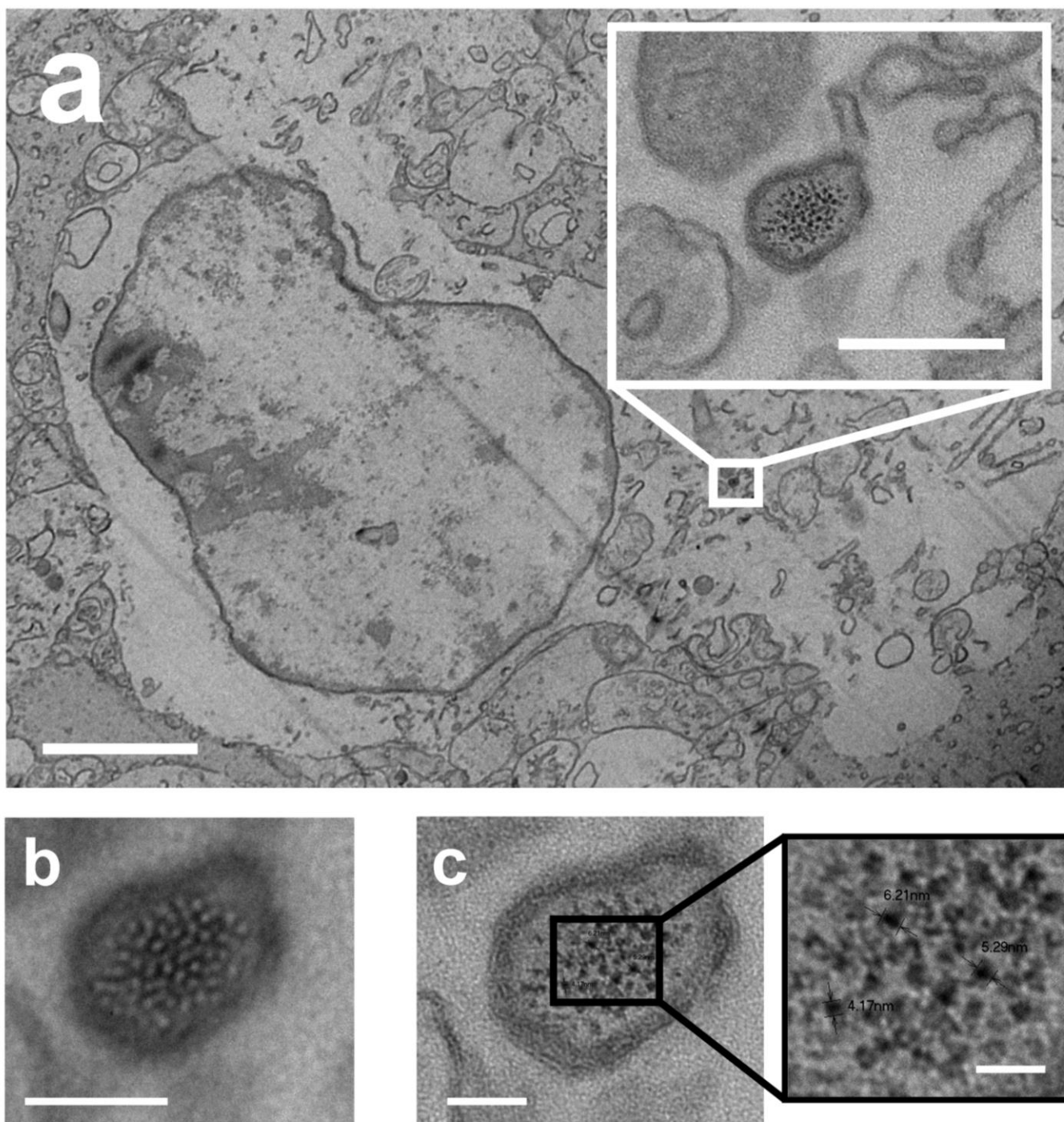
At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Annexe 6a : Micrographie électronique de la partie apicale de l'épithélium olfactif des fœtus F1 issus de mères exposées présentant des dépôts opaques aux électrons. La figure a montre le micrographe présenté en Figure C4b1. La structure dans le cadre blanc est présentée dans les figures b et c. La validation de la présence des dépôts opaques aux électrons ressemblant à des particules a été réalisée en faisant varier la focale de la caméra (figure b). La mesure de la taille des dépôts unitaires a été réalisée de manière automatique par le logiciel incorporé dans le poste de microscopie électronique dont dispose la plateforme MIMA2 de l'INRA de Jouy en Josas. Ce logiciel a calculé automatiquement le diamètre des dépôts (figure c). Barres d'échelle : a : 500 nm ; b et c : 250 nm. **mi** : mitochondrie.



Annexe 6b : Micrographie électronique de la couche glomérulaire du bulbe olfactif des fœtus F1 issus de mères exposées présentant des dépôts opaques aux électrons. La **figure a** montre le micrographe présenté en Figure C5a1. La structure ciblée dans le cadre blanc est présentée en haut à droite à un grossissement plus élevé, ainsi que dans les **figures b et c**. La validation de la présence des dépôts opaques aux électrons ressemblant à des particules a été réalisée en faisant varier la focale de la caméra (**figure b**). La mesure de la taille des dépôts unitaires a été réalisée de manière automatique par le logiciel incorporé dans le poste de microscopie électronique dont dispose la plateforme MIMA2 de l'INRA de Jouy en Josas. Ce logiciel a calculé automatiquement le diamètre des dépôts (**figure c**). Barres d'échelle : a : 2.5 μm et 200 nm, respectivement ; b : 100 nm ; c : 50 et 20 nm, respectivement.

Liste des communications

Articles originaux

Bernal-Meléndez E, Lacroix MC, Bouillaud P, Callebert J, Olivier B, Persuy MA, 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, Part Fibre Toxicol. 2019 Jan 17;16(1):5. doi: 10.1186/s12989-018-0288-7.

Bernal-Meléndez E et al., Long-term effects of gestational exposure to diesel exhaust particles reveal sex differences of pollution on brain monoamine neurochemistry (en rédaction).

Communications ou posters dans des congrès à comité de lecture

Bernal Meléndez, E., Lacroix, M.-C., Callebert, J., Durieux, D., Persuy, M.-A., Aioun, J., Valentino, S., Rousseau Ralliard, D., Tarrade, A., Chavatte Palmer, P., Schroeder, H. and Baly, C. Short-term effects of daily exposure to diesel exhaust during gestation on the olfactory system development in rabbit pups. 14th International Congress of Toxicology (2016-10-02-2016-10-06) Merida (MEX). In: XIV International Congress of Toxicology in conjunction with the X Mexican Congress of Toxicology. (IRL): Elsevier Ireland Ltd (Toxicology Letters, 259 (Supplement)), 2016. 269 p. (**Poster**)

Bernal-Meléndez E, Lacroix MC, Callebert J, Durieux D, Persuy MA, Aioun 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 rabbits' pups. 1st International Meeting for Environment & Health (Strasbourg 30 Novembre 2016 - 1 décembre 2016). (**Com**)

Bernal Meléndez, E. , Lacroix, M.-C. , Callebert, J. , Durieux, D. , Persuy, M.-A. , Aioun, J. , Valentino, S. , Rousseau Ralliard, D. , Tarrade, A. , Chavatte Palmer, P. , Schroeder, H. and Baly, C. J3P - journée « Nanoparticules : quels risques, quelles protections ? » (13 octobre 2016, Nancy). Short-term effects of daily exposure to diesel exhaust during gestation on the olfactory system development in rabbits pups. (**Poster**)

Bernal-Meléndez E, Lacroix MC, Callebert J, Longin C, Durieux D, Persuy MA, Aioun J, Valentino S, Rousseau-Ralliard D, Tarrade A, Chavatte-Palmer P, Schroeder H and Baly C. Short-term effects of a gestational exposure to diesel exhaust on the olfactory system development in rabbit pups. Journée scientifique de la SCMC (6 Mars 2017, Paris). (**Com**)

Bernal-Meléndez E, Bouillaud P, Callebert J, Olivier B, Lacroix MC, Durieux D, Persuy MA, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Chavatte-Palmer P, Baly C, and Schroeder H. A daily exposure of rabbit dams to diesel exhaust nanoparticles during gestation impairs the brain and olfactory dopaminergic pathways of offspring NanoSafety Congress (11-13 Octobre 2017, Saarbrücken). (**Com**)

Bernal-Meléndez E, Bouillaud P, Callebert J, Olivier B, Lacroix MC, Durieux D, Persuy MA, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Chavatte-Palmer P, Baly C, Schroeder H. Brain and olfactory

dopaminergic pathways are impaired in rabbit pups daily exposed to diesel exhaust nanoparticles during gestation. 2nd International Meeting for Environment & Health, Strasbourg 29 Nov-01 Décembre 2017. (**Com**)

Bernal-Meléndez E, Bouillaud P, Callebert J, Chavatte-Palmer P, Baly C, Schroeder H. A daily gestational exposure to diesel exhaust particles impaired the brain and olfactory dopaminergic pathways of rabbit pups. (Nanosafe 2018, 5-9 Novembre 2018). (**Com**)

Bibliographie

- Abbott N.J., Ronnback, L. and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41–53.
- ADEME. (2005). Les particules de combustion automobile et leurs dispositifs d'élimination. *Rapport ADEME*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl441>
- ADEME. (2012). Energie et climat _les mots clés.
- ADEME. (2018). Émissions de particules, 1–11.
- Aimé, P. (2010). Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1: "Etude de la modulation de la détection olfactive par les états alimentaires et métaboliques".
- AirParif (2008). Directive 2008/50/CE du parlement européen du conseil du 21 mai 2008 concernant la qualité de l'air ambiant et un air pur pour l'Europe.
- AirParif (2016) Surveillance et information sur la qualité de l'air en Ile-de-France - Bilan année 2015.
- Ajmani GS., Suh HH. and Pinto JM. (2016). Effects of Ambient Air Pollution Exposure on Olfaction: A Review. *Environ Health Perspect.* 124(11):1683-1693. Epub 2016 Jun 10.
- Al Aïn, S., Belin, L., Schaal, B. and Patris, B. (2012). How does a newly born mouse get to the nipple? odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses. *Developmental Psychobiology*. 55(8), 888–901. doi:10.1002/dev.21082
- Albanese, A., Tang, P. S., and Chan, W. C. W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 14(1), 1–16. doi:10.1146/annurev-bioeng-071811-150124
- Alex, K. D. and Pehek, E. A. (2007). Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission, 113, 296–320. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.08.004>
- 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. (2015). Analysis of nanoparticle-protein coronas formed in vitro between nanosized welding particles and nasal lavage proteins. *Nanotoxicology*, 10(2), 226–234. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048324>
- Allen, J. L., Conrad, K., Oberdörster, G., Johnston, C.J., Sleezer, B. and Cory-Slechta, DA. (2013). Developmental exposure to concentrated ambient particles and preference for immediate reward in mice. *Environmental Health Perspectives*, 121(1), 32–38. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205505>
- Allen, J. L., Liu, X., Weston, D., Prince, L., Oberdörster, G., Finkelstein, J. N., ... Cory-Slechta, DA. (2014a). 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*, 140(1), 160–178. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu059>
- Allen, J. L., Liu, X., Pelkowski, S., Palmer, B., Conrad, K., Oberdörster, G., Weston, D., Mayer-Pröschel, M. and Cory-Slechta, DA. (2014b). Early Postnatal Exposure to Ultrafine Particulate Matter Air Pollution: Persistent Ventriculomegaly, Neurochemical Disruption, and Glial Activation Preferentially in Male Mice. *Environmental Health Perspectives*, 122(May), 939–945. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307984>
- Alvarez, J. I., Katayama, T. and Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, 61(12), 1939–1958. <https://doi.org/10.1002/glia.22575>
- ANSES. (2018). Rapport Final Projet financé dans le cadre du PNR EST, 1–30.
- Antiñolo, M., Willis, M. D., Zhou, S. and Abbatt, J. P. D. (2015). Connecting the oxidation of soot to its redox cycling abilities. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7812>
- Antonelli MC., Pallarés ME., Ceccatelli S. and Spulber S. (2017). Long-term consequences of prenatal stress and neurotoxicants exposure on neurodevelopment. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.05.005>
- Astic, L., Saucier, D., Coulon, P., Lafay, F. and Flamand, A. (1993). The CVS strain of rabies virus as transneuronal tracer in the olfactory system of mice. *Brain Research*, 619(1–2), 146–156. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91606-S](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91606-S)
- Back SA., Riddle A., Dean J. and Hohimer, AR. (2012). The instrumented fetal sheep as a model of cerebral white matter injury in the premature infant. *Neurotherapeutics*. 9(2):359-70. doi: 10.1007/s13311-012-0108-y.
- Badonnel, K., Lacroix, MC., Monnerie, R., Durieux, D., Caillol, M. and Baly, C. (2012). Chronic restricted access to food leading to undernutrition affects rat neuroendocrine status and olfactory-driven behaviors. *Hormones and Behavior*, 62(2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.05.010>

- Bai, N., Khazaei, M., van Eeden, SF., & Laher, I. (2007). The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. *Pharmacology and Therapeutics*, 113(1), 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.06.005>
- 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. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorders in a Total Population Sample-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*, 67(6), 1–25. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>
- Banks, WA. (2015). The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 44(August), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.08.007>
- Becerra, TA., Wilhelm, M., Olsen, J., Cockburn, M. and Ritz, BR. (2013). Ambient air pollution and autism in Los Angeles county, California. *Environmental Health*, 121(3), 380–386. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205827>
- Belluscio L, Lodovichi C, Feinstein P, Mombaerts P, Katz LC. (2002). Odorant receptors instruct functional circuitry in the mouse olfactory bulb. *Nature*. 419: 296-300.
- Bencsik, A., Lestaevél, P. and Guseva Canu, I. (2018). Nano- and neurotoxicology: An emerging discipline. *Progress in Neurobiology*, 160, 45–63. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.003>
- Bernard JF., Baeza A., Bonneau S., Debert C., De Pas A., Favez O., Garnoussi P., Gherzi V., Joly F., Kauffmann A., Laj P., Le Treut H. and Laj P. (2014). Le carbone suie : enjeu présent et futur. *Airparif Actu N° 42*, (Décembre), 12. Retrieved from http://www.airparif.asso.fr/_pdf/publications/NUMERO42.pdf
- Block, ML., Wu, X., Pei, Z., Li, G., Wang, T., Qin, L., Wilson, B., Yang, J., Hong, JS and Veronesi, B. (2004). Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(13), 1618–1620. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1945fje>
- Block, ML. & Hong, JS. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
- Block, ML. and Calderón-garcidueñas, L. (2010). Air Pollution: Mechanisms of Neuroinflammation & CNS Disease. *Trends Neurosci.* NIH Public Access, 32(9), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.009>
- 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. (2012). The Outdoor Air Pollution and Brain Health Workshop. *Neurotoxicology*. NIH Public Access, 33(5), 972–984. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.014>
- Blokland, A. (1995). Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Reviews*, 21(3), 285–300. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(95\)00016-X](https://doi.org/10.1016/0165-0173(95)00016-X)
- Blunk, T., Hochstrasser, DF., Sanchez, JC., Muller, BW. and Muller, RH. (1993). Colloidal carriers for intravenous drug targeting: Plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 14(12), 1382–1387. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0027730863&partnerID=40&md5=a43b3401c054cb4b87fe3bb5d6940adc>
- Bolton, JL., Huff, NC., Smith, SH., Mason, SN., Foster, WM., Auten, R. L. and Bilbo, SD. (2013). Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 1075–1082. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306560>
- Bolton, JL., Auten, RL. and Bilbo, SD. (2014). Prenatal air pollution exposure induces sexually dimorphic fetal programming of metabolic and neuroinflammatory outcomes in adult offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.029>

- Bolton, JL., Marinero, S., Hassanzadeh, T., Natesan, D., Le, D., Belliveau, C., Mason, SN., Auten, RL. and Bilbo, SD. (2017). Gestational exposure to air pollution alters cortical volume, microglial morphology, and microglia-neuron interactions in a sex-specific manner. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 9(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2017.00010>
- Bos, I., De Boever, P., Emmerechts, J., Buekers, J., Vanoirbeek, J., Meeusen, R. and Panis, LI. (2012). Changed gene expression in brains of mice exposed to traffic in a highway tunnel. *Inhalation Toxicology*, 24(10), 676–686. doi:10.3109/08958378.2012.714004
- Bourdrel T., Bind MA., Béjot Y., Morel O. and Argacha JF. (2017). Cardiovascular effects of air pollution. *Arch Cardiovasc Dis*. 110(11): 634-642. doi: 10.1016/j.acvd.2017.05.003.
- Bourotte, C., Forti, MC., Taniguchi, S., Bicego, MC. and Lotufo, PA. (2005). A wintertime study of PAHs in fine and coarse aerosols in São Paulo city, Brazil. *Atmospheric Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.02.054>
- Buck L and Axel R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65: 175-87.
- Buck LB. (2000). The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*. 100: 611-8.
- Buzea, C., Pacheco, II. and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*. 2(4), MR17–MR71. doi:10.1116/1.2815690
- CAFE. (2004). Second Position Paper on Particulate Matter, 234.
- CAFE. (2005). 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.
- Calderón-Garcidueñas, L., Valencia-Salazar, G., Rodríguez-Alcaraz, A., Gambling, TM., García, R., Osnaya, N., Villarreal-Calderón, A., Devlin, RB. and Carson, JL. (2001). Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(2), 132–138. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.2.4157>
- Calderón-Garcidueñas. (2002). Safety Evaluation — Environmental Air Pollution and Brain Damage, 30(3), 373–389.
- 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. (2003). 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*, 31(5), 524–538. <https://doi.org/10.1080/01926230309789>
- 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., Herritt L., Brooks D., Osnaya-Brizuela N., Monroy ME., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Villarreal-Calderon R., Solt AC. and Engle RW. (2008a). Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: A pilot study with children and dogs. *Brain and Cognition*, 68(2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.04.008>
- 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. (2008b). 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*, 36(2), 289–310. <https://doi.org/10.1177/0192623307313011>
- Calderón-Garcidueñas, L., Franco-Lira M., Henríquez-Roldán C., Osnaya N., González-Maciel A., Reynoso-Robles R., Villarreal-Calderon R., Herritt L., Brooks D., Keefe S., Palacios-Moreno J., Villarreal-Calderon R., Torres-Jardón R., Medina-Cortina H., Delgado-Chávez R., Aiello-Mora M., Maronpot RR. and Doty RL. (2010). Urban air pollution: Influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(1), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.02.117>

- Calderon-Garciduenas, L., Calderon-Garciduenas, A., Torres-Jardon, R., Avila-Ramirez, J., Kulesza, R. J. and Angiulli, AD. (2014). Air pollution and your brain: what do you need to know right now. *Prim Health Care Res Dev*, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S146342361400036X>
- Calderón-Garcidueñas, L., Kulesza, RJ., Doty, RL., Angiulli, AD. and Torres-jardón, R. (2015). Megacities air pollution problems : Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environmental Research*, 137, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.012>
- Calderón-Garcidueñas, L., Reynoso-Robles, R., Vargas- Martínez, J., Gómez-Maqueo-Chew, A., Pérez-Guillé, B., Mukherjee, PS., Torres-Jardón R., Perry G., and González-Maciel, A. (2016). 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*, 146, 404–417. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.031>
- Calderón-Garcidueñas, L. and Villarreal-Ríos, R. (2017). Living close to heavy traffic roads, air pollution, and dementia. *The Lancet*, 389(10070), 675–677. doi:10.1016/s0140-6736(16)32596-x
- Campbell, A., Oldham, M., Becaria, A., Bondy, SC., Meacher, D., Sioutas, C. and Kleinman, M. (2005). Particulate Matter in Polluted Air May Increase Biomarkers of Inflammation in Mouse Brain. *NeuroToxicology*. 26(1), 133–140. doi:10.1016/j.neuro.2004.08.003.
- Campen, M., Robertson, S., Lund, A., Lucero, J. and McDonald, J. (2014). Engine exhaust particulate and gas phase contributions to vascular toxicity. *Inhalation Toxicology*, 26(6), 353–360. <https://doi.org/10.3109/08958378.2014.897776>
- Campos-Bedolla, P., Walter, FR., Veszeka, S. and Deli, MA. (2014). Role of the Blood-Brain Barrier in the Nutrition of the Central Nervous System. *Archives of Medical Research*, 45(8), 610–638. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.11.018>
- Carpenter, K. and Johnson JH. (1979). Analysis of the Physical Characteristics of Diesel Particulate Matter Using Transmission Electron Microscope Techniques - SAE Paper No. 790815. *Sae*, 2743–2759.
- Carson, KA. and Burd, GD. (1980). Localization of acetylcholinesterase in the main and accessory olfactory bulbs of the mouse by light and electron microscopic histochemistry. *Journal of Comparative Neurology*, 191(3), 353–371. <https://doi.org/10.1002/cne.901910304>
- Carter, AM. (2007). Animal Models of Human Placentation - A Review. *Placenta*, 28(SUPPL.), S41–S47. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.11.002>
- Castillo, PE., Carleton, A., Vincent, J. and Lledo, P. (1999). Multiple and Opposing Roles of Cholinergic Transmission in the Main Olfactory Bulb, 19(21), 9180–9191.
- Centenaro, LA., Vieira K., Zimmermann N., Miczek KA., Lucion AB. and de Almeida RM. (2008). Social instigation and aggressive behavior in mice: role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 201(2), 237–248. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1269-6>
- Chan, TL., Ning, Z., Wang, JS., Cheung, CS., Leung, CW. and Hung, WT. (2007). Gaseous and particle emission factors from the selected on-road petrol/gasoline, diesel, and liquefied petroleum gas vehicles. *Energy and Fuels*, 21(5), 2710–2718. <https://doi.org/10.1021/ef070172i>
- Charra, R., Datiche, F., Casthano, A., Gigot, V., Schaal, B. and Coureaud, G. (2012). Brain processing of the mammary pheromone in newborn rabbits. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 179–188. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.008
- Charra, R., Datiche, F., Gigot, V., Schaal, B. and Coureaud, G. (2013). Pheromone-induced odor learning modifies Fos expression in the newborn rabbit brain. *Behavioural Brain Research*, 237, 129–140. doi:10.1016/j.bbr.2012.09.017
- Chavatte-Palmer P., Laigre P., Simonoff E., Chesne, P., Challah-Jacques, M. and R. JP. (2008). In utero characterisation of fetal growth by ultrasound scanning in the rabbit. 69, 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.013>
- Chavatte-Palmer, P. and Tarrade, A. (2016). Placentation in different mammalian species. *Annales d'Endocrinologie*, 77(2), 67–74. doi:10.1016/j.ando.2016.04.006
- Chen JC. and Schwartz J. Neurobehavioral effects of ambient air pollution on cognitive performance in US adults. *Neurotoxicology*. (2009). 30(2):231–239. doi:10.1016/j.neuro.2008.12.011.

- Chen, H., Kwong, J.C., Copes, R., Tu, K., Villeneuve, P.J., van Donkelaar, A., Hystad, P., Martin, R.V., Murray, B.J., Jessiman, B., Wilton, A.S., Kopp, A. and Burnett, R. T. (2017). Living near major roads and the incidence of dementia, Parkinson's disease, and multiple sclerosis: a population-based cohort study. *The Lancet*, 389(10070), 718–726. doi:10.1016/s0140-6736(16)32399-6
- Cheng, Y.S., Yeh, H.C., Mauderly, J.L. and Mokler, B.V. (1984). Characterization of diesel exhaust in a chronic inhalation study. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45:547-55
- CITEPA. (2015). 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)., 333 p.
- Clark C., Crombie R., Head J., van Kamp I., van Kempen E. and Stansfeld SA. (2012). Does traffic-related air pollution explain associations of aircraft and road traffic noise exposure on children's health and cognition? A secondary analysis of the United Kingdom sample from the RANCH project. *Am J Epidemiol.* 176(4):327–337. doi: 10.1093/aje/kws012
- Cleland, T.A. and Linster, C. (2005). Computation in the olfactory system. *Chemical Senses*, 30(9), 801–813. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji072>
- Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., González Villalva, A., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O.N., Jiménez-Martínez, R., Rodríguez-Rangel, D.S., Reséndiz, S. and Fortoul, T.I. (2017). Neuroprotective effect of carnosine in the olfactory bulb after vanadium inhalation in a mouse model. *Int J Exp Pathol.* 99(4):180-188. doi: 10.1111/iep.12285.
- Conceição GM., Miraglia SG., Kishi HS., Saldiva PH. and Singer JM (2001). Air pollution and child mortality: A time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Environmental Health Perspectives*, 109, 347–350. <https://doi.org/10.2307/3434781>.
- Costa, L.G., Cole, T.B., Coburn, J., Chang, Y.C., Dao, K. and Roque, P. (2014). 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*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/736385>
- Coureaud G., Charra R., Datiche F., Sinding C., Thomas-Danguin T., Languille S., Hars B. and Schaal. B. (2010). A pheromone to behave, a pheromone to learn: The rabbit mammary pheromone. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 196(10), 779–790. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0548-y>
- Coureaud, G., Langlois, D., Sicard, G. and Schaal, B. (2004). Newborn rabbit responsiveness to the mammary pheromone is concentration-dependent. *Chemical Senses*, 29(4), 341–350. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjh037>
- Crawford, L., Rosch, J. and Putnam, D. (2016). Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood–brain barrier to the central nervous system. *Journal of Controlled Release*. 240, 251–266. doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.041.
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R. and Schroeder, H. (2012). Late effects of a perinatal exposure to a 16 PAH mixture: Increase of anxiety-related behaviours and decrease of regional brain metabolism in adult male rats. *Toxicology Letters*, 211(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.03.005>
- Crépeaux, G., Bouillaud-Kremarik, P., Sikhayeva, N., Rychen, G., Soulimani, R., & Schroeder, H. (2013). 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*, 221(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.05.014>
- Crews L, Hunter D (1994) Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspect Dev Neurobiol* 2:151-161.
- Crüts, B., van Etten, L., Tornqvist, H., Blomberg, A., Sandstrom, T., Mills, N. L., & Borm, P. J. (2008). Exposure to diesel exhaust induces changes in EEG in human volunteers. *Particle and Fibre Toxicology*. 5(1), 4. doi:10.1186/1743-8977-5-4
- D'Angiulli, A. (2018). Severe Urban Outdoor Air Pollution and Children's Structural and Functional Brain Development, From Evidence to Precautionary Strategic Action. *Frontiers in Public Health*. 6. doi:10.3389/fpubh.2018.00095.
- Dantzer, R., Connor, J. C. O., Lawson, M. A., & Kelley, K. W. (2011). Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.09.012>

- Davis, D. a., Bortolato, M., Godar, S. C., Sander, T. K., Iwata, N., Pakbin, P., ... Morgan, T. E. (2013). Prenatal Exposure to Urban Air Nanoparticles in Mice Causes Altered Neuronal Differentiation and Depression-Like Responses. *PLoS ONE*, 8(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064128>
- Dhuria, SV., Hanson, LR. and Frey WH. (2010). Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* 99, 1654–1673. doi:<http://dx.doi.org/10.1002/jps.21924>.
- Di Bona, K. R., Xu, Y., Ramirez, P. A., DeLaine, J., Parker, C., Bao, Y., & Rasco, J. F. (2014). Surface charge and dosage dependent potential developmental toxicity and biodistribution of iron oxide nanoparticles in pregnant CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, 50, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.09.010>
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M, E. E. (2008). Serotonin control of central dopaminergic function: focus on in vivo microdialysis studies, 172, 7–44. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00902-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00902-3)
- Dobbing, J. and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*. 3(1), 79–83. doi:10.1016/0378-3782(79)90022-7
- Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., Knauer, S. K., & Stauber, R. H. (2015). The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6094–6121. <https://doi.org/10.1039/c5cs00217f>
- Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L. A., Duffin, R., Newby, D. E., Mills, N., ... Stone, V. (2005). Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-2-10>
- Dorman, D. C., Struve, M. F., Wong, B. A., Dye, J. A., & Robertson, I. D. (2006). Correlation of brain magnetic resonance imaging changes with pallidal manganese concentrations in rhesus monkeys following subchronic manganese inhalation. *Toxicological Sciences*, 92(1), 219–227. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj209>
- Dos Santos Coura, R., & Granon, S. (2012). Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychopharmacology*, 221(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2596-6>
- Doty RL, Perl DP, Steele JC, Chen KM, Pierce JD, Reyes P, Kurland LT. (1991). Olfactory dysfunction in three neurodegenerative diseases. *Geriatrics*. 46(Suppl 1):47–51. [PubMed: 1894145]
- Doty, R. L. (2008). The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: Is it viable? *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.21327>
- Doty, R. L. (2012a). Neurobiology of Disease Olfaction in Parkinson ' s disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, 46(3), 527–552. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.026>
- Doty, R. L. (2012b). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol Dis.*, 46(3), 527–552. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.10.026>.Olfaction
- Doty, R. L. (2012c). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 8(6), 329–339. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.80>
- Drobyshevsky, A., Derrick ,M., Luo, K., Zhang, LQ., Wu, YN., Takada, SH., Yu, L. and Tan, S. (2012). Near-term fetal hypoxia-ischemia in rabbits: MRI can predict muscle tone abnormalities and deep brain injury. *Stroke*. 43(10):2757-63. doi:10.1161/STROKEAHA.112.653857.
- Duan, X. and Li, Y. (2013). Physicochemical Characteristics of Nanoparticles Affect Circulation, Biodistribution, Cellular Internalization, and Trafficking. *Small*. 9(9-10), 1521–1532. doi:10.1002/sml.201201390.
- Dubovický, M., Kovačovský, P., Ujházy, E., Navarová, J., Brucknerová, I., & Mach, M. (2008). Evaluation of developmental neurotoxicity: some important issues focused on neurobehavioral development. *Interdiscip Toxicol*. 1(3-4):206-10. doi: 10.2478/v10102-010-0042-y.
- Duhaime, AC., Margulies, SS., Durham, SR., O'Rourke, MM., Golden, JA., Marwaha, S. and Raghupathi, R. (2000). Maturation-dependent response of the piglet brain to scaled cortical impact. *Journal of Neurosurgery*, 93(3), 455–462. doi:10.3171/jns.2000.93.3.0455
- Duhaime, AC., Hunter, JV., Grate, LL., Kim, A., Golden, J., Demidenko, E. and Harris, C. (2003). Magnetic resonance imaging studies of age-dependent responses to scaled focal brain injury in the piglet. *Journal of Neurosurgery*, 99(3), 542–548. doi:10.3171/jns.2003.99.3.0542

- Duhaime, AC. (2006). Large Animal Models of Traumatic Injury to the Immature Brain. *Developmental Neuroscience*, 28(4-5), 380–387. doi:10.1159/000094164
- Dumont, M., Lalonde, R., Ghersi-Egea, J. F., Fukuchi, K., & Strazielle, C. (2006). 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*, 113(9), 1225–1241. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0373-6>
- Edwards SC., Jedrychowski W., Butscher M., Camann D., Kieltyka A., Mroz E., Flak E., Li Z., Wang S., Rauh V. and Perera F. (2010). Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect.* 118(9):1326-31. doi: 10.1289/ehp.0901070.
- EEA. (2016a). Explaining road transport emissions. ISBN 978-92-9213-723-6 doi:10.2800/71804.
- EEA. (2016b). *Perspectives on systems engineering advances in process and product design. Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63433-7.50001-8>
- Eerens, H., Petroula, D., Cofala, J., Kalognomou, L., Larssen, S., van Pul, A., Giannouli, M., Mellios, G., Jonson, Je., Swart, R., van Bree, L., Hettelingh, JP., 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. and Adams, M. (2005). European Environmental Outlook 2005 : Background document air quality 1990-2030.
- Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J. and Oberdorster, G. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environmental Health Perspectives*, 114(8), 1172–1178. <https://doi.org/10.1289/ehp.9030>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ema, M., Naya, M., Horimoto, M., & Kato, H. (2013). Developmental toxicity of diesel exhaust: A review of studies in experimental animals. *Reproductive Toxicology*, 42, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.074>
- Ennis, Matthew, Shipley, M. T. (1996). Functional organization of. *Journal of Neurobiology*, 30(1), 123–176.
- Ennis, M., Zhou, F.-M., Ciombor, K. J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., ... Shipley, M. T. (2001). Dopamine D2 Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals. *Journal of Neurophysiology*, 86(6), 2986–2997. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.6.2986>
- Ennis, M., Hamilton, K. A., & Hayar, A. (2007). Neurochemistry of the main olfactory system. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Sensory Neurochemistry*, 137–204. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30374-1_6
- Escanilla, O., Yuhas, C., Marzan, D., & Linster, C. (2009). Dopaminergic Modulation of Olfactory Bulb Processing Affects Odor Discrimination Learning in Rats. *Behavioral Neuroscience*, 123(4), 828–833. <https://doi.org/10.1037/a0015855>
- Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada-Ovalle, I., & Segura-Medina, P. (2016). Aeroparticles, composition, and lung diseases. *Frontiers in Immunology*, 7(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00003>
- Fatima, M., Srivastav, S., & Mondal, A. C. (2017). Prenatal stress and depression associated neuronal development in neonates. *International Journal of Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.04.001>
- Feinstein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*. 13; 413(6852):211-8.
- Feinstein, P. and Mombaerts, P. (2004). A Contextual Model for Axonal Sorting into Glomeruli in the Mouse Olfactory System. *Cell*, 117(6), 817–831. doi:10.1016/j.cell.2004.05.011.
- Finnie, J. (2012). Comparative approach to understanding traumatic injury in the immature, postnatal brain of domestic animals. *Australian Veterinary Journal*. 90(8), 301–307. doi:10.1111/j.1751-0813.2012.00955.x
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Santos, A. N., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1–10. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0091>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006) Les impacts de l'élevage sur l'environnement. URL <http://www.fao.org/ag/fr/magazine/0612sp1.htm>.
- Fonken, L. K., Xu, X., Weil, Z. M., Chen, G., Sun, Q., Rajagopalan, S., & Nelson, R. J. (2011). Air pollution impairs cognition, provokes depressive-like behaviors and alters hippocampal cytokine expression and morphology. *Molecular Psychiatry*, 16(10), 987–995. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.76>
- Fox SH, Chuang R, Brotchie JM. (2009). Serotonin and Parkinson's disease: on movement, mood, and madness. *Mov Disord*. 24:1255–1266. [PubMed: 19412960]
- Freire, C., Ramos, R., Puertas, R., Lopez-Espinosa, M.-J., Julvez, J., Aguilera, I., ... Olea, N. (2010). Association of traffic-related air pollution with cognitive development in children. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 64(3), 223–228. <https://doi.org/10.1136/jech.2008.084574>
- Friess, SH., Ichord, RN., Owens, K., Ralston, J., Rizol, R., Overall, KL., Smith, C, Helfaer, MA. and Margulies, SS. (2007). Neurobehavioral functional deficits following closed head injury in the neonatal pig. *Experimental Neurology*. 204(1), 234–243. doi:10.1016/j.expneurol.2006.10.010
- Gamache, P., Ryan, E., Svendsen, C., Murayama, K., & Acworth, I. N. (1993). Simultaneous measurement of monoamines, metabolites and amino acids in brain tissue and microdialysis perfusates. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 614(2), 213–220. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80311-Q](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80311-Q)
- Geller, M. D., Ntziachristos, L., Mamakos, A., Samaras, Z., Schmitz, D. A., Froines, J. R., & Sioutas, C. (2006). Physicochemical and redox characteristics of particulate matter (PM) emitted from gasoline and diesel passenger cars. *Atmospheric Environment*, 40(36), 6988–7004. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.06.018>
- Genc, S., Zadeoglulari, Z., Fuss, S. H., & Genc, K. (2012). The adverse effects of air pollution on the nervous system. *Journal of Toxicology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/782462>
- Genter, M. B., Kendig, E. L., & Knutson, M. D. (2009). Uptake of materials from the nasal cavity into the blood and brain: Are we finally beginning to understand these processes at the molecular level. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 623–628. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03877.x>
- Gerlofs-Nijland, M. E., van Berlo, D., Cassee, F. R., Schins, R. P. F., Wang, K., & Campbell, A. (2010). Effect of prolonged exposure to diesel engine exhaust on proinflammatory markers in different regions of the rat brain. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-12>
- Ghaderi S, Fatemi Tabatabaei SR, V. H. and R. M. (2015). Abacavir induces arterial thrombosis in a murine model. *Journal of Infectious Diseases*, 218(2), 228–233. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy001>
- Ghio, A. J., Smith, C. B., & Madden, M. C. (2012). Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 18(2), 144–150. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32834f0e2a>
- Giakoumis, E. G., Rakopoulos, C. D., Dimaratos, A. M., & Rakopoulos, D. C. (2013). Exhaust emissions with ethanol or n-butanol diesel fuel blends during transient operation: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 17, 170–190. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.09.017>
- González-Domínguez, R., García-Barrera, T., & Gómez-Ariza, J. L. (2014). Metabolomic study of lipids in serum for biomarker discovery in Alzheimer's disease using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 98, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.023>
- González-Macié, A., Reynoso-Robles, R., Torres-Jardón, R., Mukherjee, P. S., & Calderón-Garcidueñas, L. (2017). Combustion-Derived Nanoparticles in Key Brain Target Cells and Organelles in Young Urbanites: Culprit Hidden in Plain Sight in Alzheimer's Disease Development. *Journal of Alzheimer's Disease*, 59(1), 189–208. <https://doi.org/10.3233/JAD-170012>
- Gordon, M. N., & Finch, C. E. (1984). Topochemical localization of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in mouse brain. *Brain Res*. 18, 364–368. DOI: 10.1016/0006-8993(84)91079-5
- Gosselet F., Candela P., Cecchelli R. and Fenart L. (2011). Role of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Med Sci (Paris)*. 27(11):987-92. doi: 10.1051/medsci/20112711015.

- Graeter, L. J., & Mortensen, M. E. (1996). Kids are different: Developmental variability in toxicology. *Toxicology*, 111(1–3), 15–20. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(96\)03389-6](https://doi.org/10.1016/0300-483X(96)03389-6)
- Grandjean, P. and Landrigan, P.J. (2006). Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 368, 2167–2178
- Graziadei PP. and Graziadei GA. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol*. 8(1):1-18.
- Grizenko N, Shayan YR, Polotskaia A, Ter-Stepanian M, Joobar R. (2008). Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *J Psychiatry Neurosci*. Jan;33(1):10-6.
- Guérin, D., Peace, ST., Didier, A., Linster, C. and Cleland TA. (2008). Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. *Behav Neurosci*. 122(4):816-26. doi: 10.1037/a0012522.
- Guxens, M. and Sunyer, J. (2012). A review of epidemiological studies on neuropsychological effects of air pollution. *Swiss Medical Weekly*, (January), 1–7. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13322>
- Guxens, M., Aguilera, I., Ballester, F., Estarlich, M., Fernández-Somoano, A., Lertxundi, A., Lertxundi, N., Mendez, MA., Tardón, A., Vrijheid, M., Sunyer, J. and INMA (Infancia y Medio Ambiente) Project. (2012). Prenatal exposure to residential air pollution and infant mental development: Modulation by antioxidants and detoxification factors. *Environmental Health Perspectives*, 120(1), 144–149. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103469>
- Guxens, M., Garcia-Esteban, R., Giorgis-Allemand, L., Forns, J., Badaloni, C., Ballester, F., ... Sunyer, J. (2014). Air pollution during pregnancy and childhood cognitive and psychomotor development: Six european birth cohorts. *Epidemiology*, 25(5), 636–647. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000133>
- Guxens, M., Lubczyńska, M. J., Muetzel, R. L., Dalmau-Bueno, A., Jaddoe, V. W. V., Hoek, G., ... El Marroun, H. (2018). Air Pollution Exposure During Fetal Life, Brain Morphology, and Cognitive Function in School-Age Children. *Biological Psychiatry*, 84(4), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.01.016>
- Harris, M. H., Gold, D. R., Rifas-Shiman, S. L., Melly, S. J., Zanoibetti, A., Coull, B. A., ... Oken, E. (2016). Prenatal and childhood traffic-related air pollution exposure and childhood executive function and behavior. *Neurotoxicology and Teratology*. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.06.008>
- Hartz, A. M. S., Bauer, B., Block, M. L., Hong, J.-S., & Miller, D. S. (2008). 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*, 22(8), 2723–2733. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106997>
- HEI. (2013). Multidimensional Ecosystemic Comparative Approach (MECA). <https://doi.org/10.1177/0333102414566196>
- Hess, HH. and Pope, A. (1953). Ultramicrospectrophotometric determination of cytochrome oxidase for quantitative histochemistry. *J Biol Chem*. 204(1):295-306
- Heusinkveld, H. J., Wahle, T., Campbell, A., Westerink, R. H. S., Tran, L., Johnston, H., ... Schins, R. P. F. (2016). Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *NeuroToxicology*, 56, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.007>
- Hoek, G., Brunekreef, B., Goldbohm, S., Fischer, P., & Van Den Brandt, P. A. (2002). Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: A cohort study. *Lancet*, 360(9341), 1203–1209. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11280-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11280-3)
- Höglinger, G. U., Alvarez-Fischer, D., Arias-Carrión, O., Djufri, M., Windolph, A., Keber, U., ... Oertel, W. H. (2015). A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathologica*, 130(3), 333–348. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1451-y>
- Hong, J.-S., Park, M.-K., Kim, M.-S., Lim, J.-H., Park, G.-J., Meang, E.-H., ... Shin, H.-C. (2014a). Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 159. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57932>
- Hong, J. S., Park, M. K., Kim, M. S., Lim, J. H., Park, G. J., Maeng, E. H., ... Shin, H. C. (2014b). Effect of zinc oxide nanoparticles on dams and embryo–fetal development in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 145–157. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57931>

- Hopkins, L. E., Patchin, E. S., Chiu, P. L., Brandenberger, C., Smiley-Jewell, S., & Pinkerton, K. E. (2014). Nose-to-brain transport of aerosolised quantum dots following acute exposure. *Nanotoxicology*, 8(8), 885–893. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.842267>
- Hornykiewicz, O. (1971): Pharmacology and pathophysiology of dopaminergic neurons. *Adv. Cytopharmacol.*, 1, 369-377.
- Hougaard, K. S., Jensen, K. a, Nordly, P., Taxvig, C., Vogel, U., Saber, A. T., & Wallin, H. (2008). Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-3>
- Hougaard, KS., Saber, AT., Jensen, KA., Vogel, U. and Wallin, H. (2009). Diesel Exhaust Particles: Effects on Neurofunction in Female Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 105(2), 139–143. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00407.x
- Hougaard, K. S., Campagnolo, L., Chavatte-Palmer, P., Tarrade, A., Rousseau-Ralliard, D., Valentino, S., ... Cassee, F. R. (2015). A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reproductive Toxicology*, 56, 118–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.015>
- Huot, P., Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2011). The serotonergic system in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 95(2), 163–212. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.004>
- Ibald-Mulli, a, Wichmann, H. E., Kreyling, W., & Peters, a. (2002). Epidemiological evidence on health effects of ultrafine particles. *J Aerosol Med*, 15(2), 189–201. <https://doi.org/10.1183/09031936.00198013>
- Ibanez, C., Suhard, D., Tessier, C., Delissen, O., Lestaevél, P., Dublineau, I., & Gourmelon, P. (2014). Intranasal exposure to uranium results in direct transfer to the brain along olfactory nerve bundles. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(4), 477–488. <https://doi.org/10.1111/nan.12061>
- IFEN. (2006). L ' environnement en France.
- Imai, T. (2014). Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 35, 180–188. doi:10.1016/j.semcdb.2014.07.012.
- Imtenan, S., Varman, M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Sajjad, H., Arbab, M. I., & Rizwanul Fattah, I. M. (2014). Impact of low temperature combustion attaining strategies on diesel engine emissions for diesel and biodiesels: A review. *Energy Conversion and Management*, 80(x), 329–356. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.01.020>
- Jenkins, EK., DeChant, MT. and Perry, EB. (2018). When the Nose Doesn't Know: Canine Olfactory Function Associated With Health, Management, and Potential Links to Microbiota. *Frontiers in Veterinary Science*. 5. doi:10.3389/fvets.2018.00056
- Jong, W. H. De, Burger, M. C., Verheijen, M. A., & Geertsma, R. E. (2010). Detection of the Presence of Gold Nanoparticles in Organs by Transmission Electron Microscopy, 4681–4694. <https://doi.org/10.3390/ma3094681>
- Jonson, J. E., Borken-Kleefeld, J., Simpson, D., Nyíri, A., Posch, M. and Heyes, C. (2017). Impact of excess NOx emissions from diesel cars on air quality, public health and eutrophication in Europe. *Environmental Research Letters*, 12(9), 94017–94017. Retrieved from <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8850>
- Jung, C.-R., Lin, Y.-T., & Hwang, B.-F. (2013). Air Pollution and Newly Diagnostic Autism Spectrum Disorders: A Population-Based Cohort Study in Taiwan. *PLoS ONE*, 8(9), e75510. doi:10.1371/journal.pone.0075510
- Kakutani, Y., Narumi, T., Kobayakawa, T., Kawai, T., Kusakabe, Y., Kunieda, S., & Wada, Y. (2017). Taste of breath: the temporal order of taste and smell synchronized with breathing as a determinant for taste and olfactory integration. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-07285-7
- Kass, MD., Guang, SA., Moberly, A. H. and McGann, JP. (2015). Changes in Olfactory Sensory Neuron Physiology and Olfactory Perceptual Learning After Odorant Exposure in Adult Mice. *Chemical Senses*, bju065. doi:10.1093/chemse/bju065
- Kappos, A. D., Bruckmann, P., Eikmann, T., Englert, N., Heinrich, U., Höppe, P., ... Wichmann, H. E. (2004). Health effects of particles in ambient air. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207(4), 399–407. <https://doi.org/10.1078/1438-4639-00306>

- Kato, Y., Kaneko, N., Sawada, M., Ito, K., Arakawa, S., Murakami, S. and Sawamoto, K. (2012). A Subtype-Specific Critical Period for Neurogenesis in the Postnatal Development of Mouse Olfactory Glomeruli. *PLoS ONE*, 7(11), e48431. doi:10.1371/journal.pone.0048431
- Kay, L. M., & Sherman, S. M. (2007). An argument for an olfactory thalamus. *Trends in Neurosciences*, 30(2), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.11.007>
- Kema, I. P., Schellings, A. M. J., Hoppenbrouwers, C. J. M., Rutgers, H. M., de Vries, E. G. E., & Muskiet, F. A. J. (1993). High performance liquid chromatographic profiling of tryptophan and related indoles in body fluids and tissues of carcinoid patients. *Clinica Chimica Acta*, 221(1–2), 143–158. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(93\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(93)90029-4)
- Kempen, P. J., Thakor, A. S., Zavaleta, C., Gambhir, S. S., & Sinclair, R. (2013). NIH Public Access, 19(5), 1290–1297. <https://doi.org/10.1017/S143192761300192X.A>
- Kim, D., Chen, Z., Zhou, L.-F., & Huang, S.-X. (2018). Air pollutants and early origins of respiratory diseases. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, 4(2), 75–94. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.03.003>
- Kim Ki-Hyun, Kabir Ehsanul, K. S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Archives of Microbiology*, 137(3), 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>
- Kimbell JS., Godo MN., Gross EA., Joyner DR., Richardson RB. and Morgan KT. (1997). Computer simulation of inspiratory airflow in all regions of the F344 rat nasal passages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 145: 388-98.
- King-Herbert AP, Hesterburg TW, Thevenaz PP, Hamm Jr TE, Moss OR, Janszen DB, Everitt JI. (1997). Effects of Immobilization Restraint on Syrian Golden Hamsters. *Laboratory Animal Science*47(4):362-366.
- King, S., & Laplante, D. P. (2005). The effects of prenatal maternal stress on children ' s cognitive development : Project Ice Storm, 8(January 1998), 35–45. <https://doi.org/10.1080/10253890500108391>
- Kiourmourtzoglou MA., Schwartz JD., Weisskopf MG., Melly SJ, Wang Y., Dominici F. and Zanobetti A. (2016). Long-term PM2.5 Exposure and Neurological Hospital Admissions in the Northeastern United States. *Environ Health Perspect*. 124(1):23-9. doi: 10.1289/ehp.1408973.
- Kinney DK, Munir KM, Crowley DJ, Miller AM. (2008). Prenatal stress and risk for autism. *Neurosci Biobehav Rev*. Oct;32(8):1519-32. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.06.004.
- Kinoshita, Y., Shiga, H., Washiyama, K., Ogawa, D., Amano, R., Ito, M., ... Miwa, T. (2008). Thallium transport and the evaluation of olfactory nerve connectivity between the nasal cavity and olfactory bulb. *Chemical Senses*, 33(1), 73–78. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjm066>
- Kittelson DB. (1998). Engines and nanoparticles: a review. *J Aerosol Sci*. 29:575–88.
- Klocke, C., Allen, J. L., Sobolewski, M., Mayer-Pröschel, M., Blum, J. L., Lauterstein, D., ... Cory-Slechta, D. A. (2017). 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*, kfx010. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx010>
- Kraft, A. D., & Harry, G. J. (2011). Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(7), 2980–3018. doi:10.3390/ijerph8072980.
- Kreyling, WG. (2013). Dosimetry of nanomaterials after different routes of exposure. *Toxicology Letters*, 221, S6. doi:10.1016/j.toxlet.2013.06.022
- Kreyling, WG. (2016). 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*, 299, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.02.004>
- Kristiansson M., Sörman K., Tekwe C. and Calderón-Garcidueñas L. (2015). Urban air pollution, poverty, violence and health--Neurological and immunological aspects as mediating factors. *Environ Res*. 140:511-3. doi: 10.1016/j.envres.2015.05.013.
- Kyjovska, Z. O., Jacobsen, N. R., Saber, A. T., Bengtson, S., Jackson, P., Wallin, H., & Vogel, U. (2015). DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice. *Mutagenesis*, 30(4), 499–507. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev009>

- Lanphear, B. P. (2015). The Impact of Toxins on the Developing Brain. *Annual Review of Public Health*, 36(1), 211–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114413>
- Laplante, D. P., Brunet, A., Schmitz, N., Ciampi, A., & King, S. (2008). Project Ice Storm: Prenatal Maternal Stress Affects Cognitive and Linguistic Functioning in 5 2 -Year-Old Children, (September), 1063–1072. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e31817eec80>
- Laplante, D. P., Zelazo, P. R., Brunet, A., & King, S. (2007). Functional Play at 2 Years of Age: Effects of Prenatal Maternal Stress, (1).
- Laskin, DL., Mainelis, G., Turpin, BJ., Patel KJ, Sunil VR and HEI Health Review Committee. (2010). Pulmonary Effects of Inhaled Diesel Exhaust in Young and Old Mice: A Pilot Project, 18(9), 1199–1216. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Lerch, S., Dormann, C., Brandwein, C., Gass, P., & Chourbaji, S. (2016). The scent of stress: environmental challenge in the peripartum environment of mice affects emotional behaviours of the adult offspring in a sex-specific manner. *Laboratory Animals*, 50(3), 167–178. doi:10.1177/0023677215603260
- Levesque, S., Surace, M. J., McDonald, J., & Block, M. L. (2011a). Air pollution & the brain: Subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease, 1–10.
- Levesque, S., Taetzsch, T., Lull, M. E., Kodavanti, U., Stadler, K., Wagner, A., ... Block, M. L. (2011b). Diesel exhaust activates and primes microglia: Air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1149–1155. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002986>
- Lewis, J., Bench, G., Myers, O., Tinner, B., Staines, W., Barr, E., Divine, KK., Barrington, W. and Karlsson, J. (2005). Trigeminal uptake and clearance of inhaled manganese chloride in rats and mice. *Neurotoxicology*. 26, 113–123. doi:http://dx.doi.org/ 10.1016/j.neuro.2004.06.005.
- Li, W., Luxenberg, E., Parrish, T. and Gottfried, JA. (2006). Learning to Smell the Roses: Experience-Dependent Neural Plasticity in Human Piriform and Orbitofrontal Cortices. *Neuron*, 52(6), 1097–1108. doi:10.1016/j.neuron.2006.10.026
- Li, W., Howard, JD., Parrish, TB. and Gottfried, JA. (2008). Aversive Learning Enhances Perceptual and Cortical Discrimination of Indiscriminable Odor Cues. *Science*, 319(5871), 1842–1845. doi:10.1126/science.1152837
- Liati, A. and Dimopoulos Eggenschwiler, P. (2010). Characterization of particulate matter deposited in diesel particulate filters: Visual and analytical approach in macro-, micro- and nano-scales. *Combustion and Flame*. 157(9):1658-1670. DOI: 10.1016/j.combustflame.2010.02.015. ·
- Lin, CC., Yang, SK., Lin, KC., Ho, WC., Hsieh, WS., Shu, BC. and Chen, PC. (2014). Multilevel Analysis of Air Pollution and Early Childhood Neurobehavioral Development. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11(7), 6827–6841. doi:10.3390/ijerph110706827.
- Linse, S., Cabaleiro-Lago, C., Xue, W.-F., Lynch, I., Lindman, S., Thulin, E., ... Dawson, K. a. (2007). Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21), 8691–8696. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701250104>
- Lodovichi C., Belluscio L. and Katz LC. (2003). Functional topography of connections linking mirrorsymmetric maps in the mouse olfactory bulb. *Neuron*. 38: 265-76.
- Logan, DW., Brunet, LJ., Webb, WR., Cutforth, T., Ngai, J. and Stowers, L. (2012). Learned Recognition of Maternal Signature Odors Mediates the First Suckling Episode in Mice. *Current Biology*. 22(21), 1998–2007. doi:10.1016/j.cub.2012.08.041
- Lucas, G., & Spampinato, U. (2000). Role of Striatal Serotonin 2A and Serotonin 2C Receptor Subtypes in the Control of In Vivo Dopamine Outflow in the Rat Striatum.
- Lucchini, R. G., Dorman, D. C., Elder, A., & Veronesi, B. (2011). Neurological impacts from inhalation of pollutants and the nose-brain connection. *NeuroToxicology*, 33(4), 838–841. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.12.001>
- Luck W, Nau H, Hansen R, Steldinger R. (1985). Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers

- Lück, M., Paulke, B.-R., Schröder, W., Blunk, T., & Müller, R. H. (1998). Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39(3), 478–485. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980305\)39:3%3C478::AID-JBM19%3E3.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980305)39:3%3C478::AID-JBM19%3E3.0.CO;2-6)
- Machado, J. D. B., Chatkin, J. M., Zimmer, A. R., Goulart, A. P. S., & Thiesen, F. V. (2014). Cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in the amniotic fluid and fetal cord at birth and in the urine from pregnant smokers. *PLoS ONE*, 9(12), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116293>
- Maher, B. A., Ahmed, I. A. M., Karloukovski, V., MacLaren, D. A., Foulds, P. G., Allsop, D., ... Calderon-Garciduenas, L. (2016). Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(39), 10797–10801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605941113>
- Mandairon N, Ferretti CJ, Stack CM, Rubin DB, Cleland TA, Linster C. (2006). Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. *Eur J Neurosci*. 24:3234–3244.
- Mayer, A. C., Ulrich, A., Czerwinski, J., & Mooney, J. J. (2010). Metal-Oxide Particles in Combustion Engine Exhaust. <https://doi.org/10.4271/2010-01-0792>
- McLean, J. H., & Shipley, T. (1987). Serotonergic Afferents to the Rat Olfactory Bulb : I . Origins and Laminar Specificity of Serotonergic Inputs in the Adult Rat, 7(October).
- McLean JH, Shipley MT, Nickell WT, Aston-Jones G, R. C. (1989). Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 339–349. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.80.014108>
- Meier TB, Drevets WC, Wurfel BE, Ford BN, Morris HM, Victor TA, Bodurka J, Teague TK, Dantzer R, S. J. (2016). Relationship between neurotoxic kynurenine metabolites and reductions in right medial prefrontal cortical thickness in major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.003>. Relationship
- Mendola, P., Selevan, S. G., Gutter, S., & Rice, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(3), 188–197. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10033>
- Meisami E. (1989). A proposed relationship between increases in the number of olfactory receptor neurons, convergence ratio and sensitivity in the developing rat. *Dev Brain Res*. 46: 9-19.
- Meisami, E., Louie, J., Hudson, R. & Distel, H. (1990). *A morphometric comparison of the olfactory epithelium of newborn and weanling rabbits*. *Cell and Tissue Research*, 262(1), 89–97. doi:10.1007/bf00327749
- Mesulam, MM. and Geula, C. (1988). Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *J Comp Neurol*. 8;275(2):216-40. DOI: 10.1002/cne.902750205.
- Migliore, M., Cavarretta, F., Marasco, A., Tulumello, E., Hines, M. L., & Shepherd, G. M. (2015). Synaptic clusters function as odor operators in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), 8499–8504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502513112>
- Mills N.L., Miller M.R., Lucking A.J., Beveridge J., Flint L., Boere A.J., Fokkens P.H., Boon N.A., Sandstrom T., Blomberg A., Duffin R., Donaldson K., Hadoke P.W., Cassee F.R. & Newby D.E. (2011) Combustion-derived nanoparticulate induces the adverse vascular effects of diesel exhaust inhalation. *Eur Heart J*. 32, 2660-71.
- MohanKumar, SMJ., Campbell, A., Block, M. and Veronesi, B. (2008). Particulate matter, oxidative stress and neurotoxicity. *NeuroToxicology*. 29(3), 479–488. doi:10.1016/j.neuro.2007.12.004
- Monahan, K. and Lomvardas, S. (2015). Monoallelic Expression of Olfactory Receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 31(1), 721–740. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125308
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. and Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*. 87, 675–686.
- Mombaerts, P. (2006). Axonal Wiring in the Mouse Olfactory System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22, 713–737. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915.
- Mori, K., Kishi, K. and Ojima, H. (1983). Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 219:339-355. DOI: 10.1002/cne.902190308.

- Mori, K., Nagao, H. and Yoshihara, Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 286:711-715. DOI: 10.1126/science.286.5440.711.
- Mori, K., Takahashi, YK., Igarashi, KM. and Yamaguchi, M. (2006). Maps of Odorant Molecular Features in the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiological Reviews*, 86, 409–433. doi:10.1152/physrev.00021.2005
- Moriizumi, T., Tsukatani, T., Sakashita, H. and Miwa, T. (1994). Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 61(4), 733–738. doi:10.1016/0306-4522(94)90396-4
- Mundiñano, I. C., Caballero, M. C., Ordóñez, C., Hernandez, M., DiCaudo, C., Marcilla, I., ... Luquin, M. R. (2011). Increased dopaminergic cells and protein aggregates in the olfactory bulb of patients with neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathologica*, 122(1), 61–74. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0830-2>
- Narita M, Suzuki T, Funada M, M. M. and N. H. (1993). Blockade of the morphine-induced increase in turnover of dopamine on the mesolimbic dopaminergic system by kappa-opioid receptor activation in mice. *Life Sciences*, 52, 397–404.
- Nel, A. (2005). Air Pollution – Related Illness : Effects of Particles. *Science*, 308(5723), 804–806. <https://doi.org/10.1126/science.1108752>
- Nemmar, a., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H. M., Verbruggen, A., & Nemery, B. (2001). Passage of Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Systemic Circulation in Hamster. *About the American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(9), 1665–1668. <https://doi.org/10.1164/rccm.2101036>
- Newman, N. C., Ryan, P., LeMasters, G., Levin, L., Bernstein, D., Hershey, G. K. K., ... Dietrich, K. N. (2013). Traffic-Related Air Pollution Exposure in the First Year of Life and Behavioral Scores at 7 Years of Age. *Environmental Health Perspectives*, 121(6), 731–736. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205555>
- Oberdörster, G., Elder, A., & Rinderknecht, A. (2009). Nanoparticles and the Brain: Cause for Concern? *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(8), 4996–5007. <https://doi.org/10.1166/jnn.2009.GR02>
- Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H. and ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*. 2(1), 8. doi:10.1186/1743-8977-2-8.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., & Cox, C. (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhalation Toxicology*, 16(6–7), 437–445. <https://doi.org/10.1080/08958370490439597>
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., ... Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 65(20), 1531–1543. <https://doi.org/10.1080/00984100290071658>
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. (2001). Section 4: Health Effects. Prenatal developmental toxicity study. <https://doi.org/10.1787/20745788>
- Olivier B, Zalka L, Olry JC, Jondreville C, Bouillaud-Kremarik P, Schroeder H (2008). Perinatal exposure of rat pups to the HexaBromoCycloDoDecane (HBCDD) -isomer affects sexual maturation and copulatory behavior at the adult stage. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.283>
- Omidvarborna, H., Kumar, A., & Kim, D. S. (2015). Recent studies on soot modeling for diesel combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 48, 635–647. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.019>
- OMS. (2005). Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air: particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre, 25. <https://doi.org/WHO/SDE/PHE/OEH/06.02>
- Ostro, B., Broadwin, R., Green, S., Feng, W. Y., & Lipsett, M. (2006). Fine particulate air pollution and mortality in nine California counties: Results from CALFINE. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 29–33. <https://doi.org/10.1289/ehp.8335>

- Pardeshi, CV. and Belgamwar, VS. (2013). Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood–brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(7), 957–972. doi:10.1517/17425247.2013.790887.
- Pascal M. & Medina. S. (2011). Résumé des résultats du projet Aphekom 2008-2011. Des clefs pour mieux comprendre les impacts de la pollution atmosphérique urbaine sur la santé en Europe. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2012. 6 p. Disponible à partir de l'URL : <http://www.invs.sante.fr>
- Peiffer J, Strazielle C, Schroeder H (2008). Investigation of the brain distribution of the neuronal cytochrome oxidase activity in adult mice submitted to a subacute benzo(a)pyrene administration. doi:10.1016/j.toxlet.2008.06.672
- Peiffer J. (2011). Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine: "Étude de la neurotoxicité d'un Polluant Organique Persistant chez le rat : effets à court et à long terme de l'inhalation répétée de fluorène sur le développement sensori-moteur du jeune et le comportement à l'âge adulte".
- Peiffer, J., Cosnier, F., Grova, N., Nunge, H., Salquère, G., Decret, M. J., ... Schroeder, H. (2013). Neurobehavioral Toxicity of a Repeated Exposure (14 Days) to the Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Fluorene in Adult Wistar Male Rats. *PLoS ONE*, 8(8), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071413>
- Peiffer, J., Grova, N., Hidalgo, S., Salquère, G., Rychen, G., Bisson, J. F., ... Schroeder, H. (2016). Behavioral toxicity and physiological changes from repeated exposure to fluorene administered orally or intraperitoneally to adult male Wistar rats: A dose-response study. *NeuroToxicology*, 53, 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.11.006>
- Perera, FP., Rauh, V., Whyatt, RM., Tsai, WY., Tang, D., Diaz, D., ... Kinney, P. (2006). 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*, 114(8), 1287–1292. <https://doi.org/10.1289/ehp.9084>
- Perera FP, Li Z, Whyatt R, Hoepner L, Wang S, Camann D, Rauh V. (2009). Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. *Pediatrics*. 124(2):e195–202. doi: 10.1542/peds.2008-3506.
- Perera, FP., Tang, D., Wang, S., Vishnevetsky, J., Zhang, B., Diaz, D., ... Rauh, V. (2012). Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years. *Environmental Health Perspectives*, 120(6), 921–926. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104315>
- Peters, A., Veronesi, B., Calderón-Garcidueñas, L., Gehr, P., Chen, L. C., Geiser, M., ... Schulz, H. (2006). Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. *Particle and Fibre Toxicology*, 3, 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-3-13>
- Peterson, B. S., Rauh, V. a., Bansal, R., Hao, X., Toth, Z., Nati, G., ... Perera, F. (2015). 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*, 90027(6), 531–540. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2015.57>
- Petitjean O. (2016) Hazelwood : quel avenir pour la centrale au charbon inavouable d'Engie en Australie ? <http://multinationales.org/Hazelwood-quel-avenir-pour-la-centrale-au-charbon-inavouable-d-Engie-en>
- Petzold, G. C., Hagiwara, A., & Murthy, V. N. (2009). Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 12(6), 784–791. <https://doi.org/10.1038/nn.2335>
- Pinching, A. J., & Powell, T. P. S. (1971). the Neuron Types of the Glomerular Layer of the Olfactory Bulb. *J. Cell Sci*, 9, 305–345. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00098>
- Pope, C. A., Burnett, R. T., Thurston, G. D., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., & Godleski, J. J. (2004). Cardiovascular Mortality and Long-Term Exposure to Particulate Air Pollution: Epidemiological Evidence of General Pathophysiological Pathways of Disease. *Circulation*, 109(1), 71–77. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000108927.80044.7F>
- Popovicheva, O., Engling, G., Lin, K. T., Persiantseva, N., Timofeev, M., Kireeva, E., ... Wachtmeister, G. (2015). Diesel/biofuel exhaust particles from modern internal combustion engines: Microstructure, composition, and hygroscopicity. *Fuel*, 157, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.04.073>

- Power MC, Weisskopf MG, Alexeeff SE, Coull BA, Spiro A, III, Schwartz J. Traffic-related air pollution and cognitive function in a cohort of older men. *Environ Health Perspect.* (2010). 119(5):682–7. doi: 10.1289/ehp.1002767
- Price, J. L., & Powell, T. P. S. (1970). The Synaptology of the Granule Cells of the Olfactory Bulb. *Journal of Cell Science*, 7(1), 125–155. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/7/1/125>.
- Price, J. L., Slotnick, B. M., & Revial, M. ???F. (1991). Olfactory projections to the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 306(3), 447–461. <https://doi.org/10.1002/cne.903060309>
- Prud'homme, M. J., Lacroix, M. C., Badonnel, K., Gougis, S., Baly, C., Salesse, R., & Caillol, M. (2009). Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience*, 162(4), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.043>
- Ranft, U., Schikowski, T., Sugiri, D., Krutmann, J., and Krämer, U. (2009). Long-term exposure to traffic-related particulate matter impairs cognitive function in the elderly. *Environmental Research*, 109(8), 1004–1011. doi:10.1016/j.envres.2009.08.003
- Rao, G. V. S., Tinkle, S., Weissman, D., Antonini, J., Kashon, M., Salmen, R., ... Hoover, M. (2003). Journal of Toxicology and Environmental Health , Part A: Current Issues Efficacy of a Technique for Exposing the Mouse Lung to Particles Aspirated from the Pharynx, (February 2013), 37–41. <https://doi.org/10.1080/15287390390201839>
- REACH. (2007). Directive 2006/1907/EC on Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals (REACH). *Official Journal of the European Union*, 396, 1–849. <https://doi.org/http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:396:0001:0849:EN:PDF>
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*. 73: 597-609.
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. (1994). Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*. 79: 1245-55.
- Rey, N. L., Wesson, D. W., & Brundin, P. (2018). The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, 109, 226–248. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.013>
- Rice, D. and Barone, S Jr. (2000). Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 108(January), 1–71.
- Rodriguez, A., & Bohlin, G. (2005). Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children ?, 3, 246–254. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2004.00359.x>
- Ruiz A, Gutiérrez L, Cáceres-Vélez PR, Santos D, Chaves SB, Fascineli ML, Garcia MP, Azevedo RB, M. M. (2015). Biotransformation of magnetic nanoparticles as a function of coating in a rat model. <https://doi.org/10.1039/C5NR03780H>
- Santander-Ortega, MJ., Plaza-Oliver, M., Rodríguez-Robledo, V., Castro- Vázquez, L., Villaseca-González, N., González-Fuentes, J., Marcos, P., Arroyo-Jiménez, MM. and Lozano, MV. (2017). Colloids for drug delivery to the brain. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 42, 193-206. doi: 10.1016/j.jddst.2017.07.012
- Saraswat, L.D., Holdiness, M.R., Justice, J. B. (1981). Dopamine, homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in rat brain striatum, 222, 353–362.
- Sarnat, HB. and Yu, W. (2015). Maturation and Dysgenesis of the Human Olfactory Bulb. *Brain Pathology*. 26 (3), 301–318.doi:10.1111/bpa.12275.
- Sarnat, HB., Flores-Sarnat, L. and Wei, XC. (2017). Olfactory Development, Part 1: Function, from Fetal Perception to Adult Wine-Tasting. *Journal of Child Neurology*, 32(6), 566–578. <https://doi.org/10.1177/0883073817690867>
- Savitz, J., Drevets, W. C., Smith, C. M., Victor, A., Wurfel, B. E., Bellgowan, P. S. F., ... Teague, T. K. (2015). Putative neuroprotective and neurotoxic kynurenine pathway metabolites are associated with hippocampal and amygdalar volumes in subjects with major depressive disorder., (April), 1–39. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.194>
- Scatton, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B. and Agid, Y. (1983). Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 26;275(2):321-8. DOI: 10.1016/0006-8993(83)90993-9

- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., & Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, 424(6944), 68–72. <https://doi.org/10.1038/nature01739>
- Schaefer, ML., Bottger, B., Silver, WL. and Finger, TE. (2002). Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: a potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *J. Comp. Neurol.* 444, 221–226. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.10143>.
- Schild D and Restrepo D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol Rev.* 78: 429-66.
- Schneider, ML. (1992). Prenatal Stress Exposure Alters Postnatal Behavioral Expression Under Conditions of Novelty Challenge in Rhesus Monkey Infants, 25(October 1991), 529–540.
- Schneider, ML., Roughton, EC., Koehler, AJ. and Lubach, GR. (1999). Growth and Development Following Prenatal Stress Exposure in Primates : An Examination of Ontogenetic Vulnerability, 70(2), 263–274.
- Schneider, NY., Piccin, C., Datiche, F. and Coureaud, G. (2016). Spontaneous brain processing of the mammary pheromone in rabbit neonates prior to milk intake. *Behavioural Brain Research*, 313, 191–200. doi:10.1016/j.bbr.2016.07.014
- Schneider NY, D. F. and C. G. (2018). Brain anatomy of the 4-day-old European rabbit. *Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1111/joa.12789>
- Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, W. H. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology., 13(7), 465–477. <https://doi.org/10.1038/nrn3257>. KYNURENINES
- Schwob, JE. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec.* 15;269(1):33-49. DOI: 10.1002/ar.10047.
- Seinfeld JH, Pandis SN. (2006). Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. Second edition.
- Semmler-Behnke M., Kreyling WG., Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S, Schmid G, Brandau W. (2008). Biodistribution of 1.4- and 18-nm Gold Particles in Rats. *Small*, 4(12), 2108–2111. doi:10.1002/smll.200800922
- Semple, BD., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, DM. and Noble-Haeusslein, LJ. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*. 106-107, 1–16. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
- Serizawa S, Miyamichi K, Nakatani H, Suzuki M, Saito M, Yoshihara Y, Sakano H. (2003). Negative feedback regulation ensures the one receptor-one olfactory neuron rule in mouse. *Science*. 302: 2088-94.
- Serby, M., Flicker, C., Rypma, B., Weber, S., Rotrosen, J. P., & Ferris, S. H. (1989). Scopolamine and olfactory function. *Biological Psychiatry*, 28, 79–82. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(90\)90435-5](https://doi.org/10.1016/0006-3223(90)90435-5)
- Sharma, H. S., Ali, S. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., & Sharma, A. (2009). 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*, 9(8), 5055–5072. <https://doi.org/10.1166/jnn.2009.GR09>
- Shepherd, GM. (1972). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev.* 52:864-917. DOI: 10.1152/physrev.1972.52.4.864.
- Shipley, MT., and Adamek, GD. (1984). The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Research Bulletin*, 12, 669–688. Retrieved from [papers2://publication/uuid/064EB392-47E5-4735-8065-AB2D9DF3BB35](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/669688/)
- Siddique, S., Banerjee, M., Ray, M. R., & Lahiri, T. (2011). Attention-deficit hyperactivity disorder in children chronically exposed to high level of vehicular pollution. *European Journal of Pediatrics*, 170(7), 923–929. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1379-0>
- Sivertsen B. (2004) Air quality monitoring and management system in Ho Chi Minh, Viet Nam. BAQ Conference.
- Sivertsen B. & El Seoud A.A. (2004) The air pollution monitoring network for Egypt. International Conference on Atmospheric Pollution.

- Slama R., Thiebaugeorges O., Goua V., Aussel L., Sacco P., Bohet A., Forhan A., Ducot B., Annesi-Maesano I., Heinrich J., Magnin G., Schweitzer M., Kaminski M., Charles M.A. & Group E.M.-C.C.S. (2009) Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth. *Environ Health Perspect.* 117, 1313-21.
- Sly, PD. and Flack, F. (2008). Susceptibility of children to environmental pollutants. *Ann N Y Acad Sci.* 1140:163-83. doi: 10.1196/annals.1454.017.
- Sosulski D, Lissitsyna MV, Cutforth T, Axel R and Datta SR. (2011). Distinct Representations of Olfactory Information in Different Cortical Centers. *Nature*, 472(7342), 213–216. <https://doi.org/10.1038/nature09868>
- Spear, LP. (2004). Adolescent Brain Development and Animal Models. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1021(1), 23–26. doi:10.1196/annals.1308.002.
- Steiner, S., Bisig, C., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2016). Diesel exhaust: current knowledge of adverse effects and underlying cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 90(7), 1541–1553. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1736-5>
- Steinfeld, R., Herb, J. T., Sprengel, R., Schaefer, A. T., & Fukunaga, I. (2015). Divergent innervation of the olfactory bulb by distinct raphe nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 523(5), 805–813. <https://doi.org/10.1002/cne.23713>
- Stevens, A. and Lowe, J (2005). Human Histology. (3rd Edition).
- Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 167(3), 285–314. <https://doi.org/10.1002/cne.901670303>
- Stewart, AM. and Kalueff, AV. (2015). Developing better and more valid animal models of brain disorders. *Behavioural Brain Research.* 276, 28–31. doi:10.1016/j.bbr.2013.12.024
- Stinn, W., Teredesai, A., Anskeit, E., Rustemeier, K., Schepers, G., Schnell, P., ... Reininghaus, W. (2005). Chronic nose-only inhalation study in rats, comparing room-aged sidestream cigarette smoke and diesel engine exhaust. *Inhalation Toxicology*, 17(11), 549–576. <https://doi.org/10.1080/08958370591000564>
- Stone V., Miller MR., Clift MJD., Elder A., Mills NL., Møller P., Schins RPF., Vogel U., Kreyling WG., Alstrup Jensen K., Kuhlbusch TAJ., Schwarze PE., Hoet P., Pietroiusti A., De Vizcaya-Ruiz A., Baeza-Squiban A., Teixeira JP., Tran CL. and Cassee FR. (2017). Nanomaterials Versus Ambient Ultrafine Particles: An Opportunity to Exchange Toxicology Knowledge. *Environ Health Perspect.* 125(10):106002. doi: 10.1289/EHP424.
- Sullivan S., Friess SH., Ralston J., Smith C., Probert KJ., Rapp PE. and Margulies SS. (2013). Behavioral deficits and axonal injury persistence after rotational head injury are direction dependent. *J Neurotrauma.* 30(7):538-45. doi: 10.1089/neu.2012.2594.
- Sugamata, M., Ihara, T., Sugamata, M., and Takeda, K. (2006a). Maternal Exposure to Diesel Exhaust Leads to Pathological Similarity to Autism in Newborns. *Journal of Health Science*, 52(4), 486–488. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.486>
- Sugamata, M., Ihara, T., Takano, H., Oshio, S., and Takeda, K. (2006b). Maternal Diesel Exhaust Exposure Damages Newborn Murine Brains. *Journal of Health Science*, 52(1), 82–84. <https://doi.org/10.1248/jhs.52.82>
- Suglia SF, Gryparis A, Wright RO, Schwartz J, Wright RJ. (2007). Association of black carbon with cognition among children in a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol.* 167(3):280–6. doi:10.1093/aje/kwm3
- Sumner, SC., Fennell, TR., Snyder, RW., Taylor, GF. and Lewin, AH. (2010). Distribution of carbon-14 labeled C60 ([14C]C60) in the pregnant and in the lactating dam and the effect of C60 exposure on the biochemical profile of urine. *J Appl Toxicol.* 30(4):354-60. doi: 10.1002/jat.1503.
- Sunderman FW Jr. (2001). Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 31(1), 3–24.
- Suzuki, T., Oshio, S., Iwata, M., Saburi, H., Odagiri, T., Udagawa, T., ... Takeda, K. (2010). In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Particle and Fibre Toxicology*, 7, 7. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-7>

- Takahashi, Y., Mizuo, K., Shinkai, Y., Oshio, S., & Takeda, K. (2010). Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(5), 749–756. <https://doi.org/10.2131/jts.35.749>
- Tarrade A., Chavatte-Palmer P., Guillomot M., Camous S. and Evain-Brion D. (2014) Le placenta. La reproduction animale et humaine (ed. by Quae).
- Tilson, HA. (1998). Developmental neurotoxicology of endocrine disruptors and pesticides: identification of information gaps and research needs. *Environ. Health Perspect.* 106 Suppl 3, 807–811. doi: 10.1289/ehp.98106807.
- Tsukatani, T., Furukawa, M., Moriya, M., Tanaka, S., Okoyama, S. and Moriizumi, T. (1995). Bulbar Morphology and Expression of Bulbar Dopamine and Parvalbumin in Experimentally-induced Anosmic Rats. *Acta Oto-Laryngologica*, 115(4), 539–542. doi:10.3109/00016489509139363
- Tsukue N, Watanabe M, Kumamoto T, Takano H, and Takeda K. (2009). Perinatal exposure to diesel exhaust affects gene expression in mouse cerebrum. *Arch Toxicol.* 83:985–1000. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0459-2>.
- Tyl RW, Ballantyne B, Fisher LC, Fait DL, Savine TA, Pritts IM, Dodd DE. (1994). Evaluation of Exposure to Water Aerosol or Air by Nose-Only or Whole-Body Inhalation Procedures for CD-1 Mice in Developmental Toxicity Studies. *Toxicological Sciences*, 23(2), 251–260. doi:10.1093/toxsci/23.2.251
- USEPA. (2003). National Air Quality and Emissions Trends Report 2003 special studies edition, (September), 190.
- USEPA (2015). Air Quality: EPA's 2013 Changes to the Particulate Matter (PM) Standard (December).
- Valentino, S. A., Tarrade, A., Aioun, J., Mourier, E., Richard, C., Dahirel, M., ... Chavatte-palmer, P. (2016a). Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. *Particle and Fibre Toxicology*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0151-7>
- Valentino S. (2016b). Thèse de doctorat de l'Université Paris Saclay, préparée à l'Université de Paris Sud. " Effets multigénérationnels d'une exposition maternelle aux gaz d'échappement de moteur diesel pendant la gestation sur le développement foeto-placentaire dans un modèle lapin."
- Valentino, S., Tarrade, A. and Chavatte-Palmer, P. (2016c). Exposition aux gaz d'égappement diesel durant la gestation: quelles conséquences sur le développement foeto-placentaire? Apport des modèles animaux. *Bull. Acad. Vét. France*. Tome 169 - N°3 <http://www.academie-veterinaire-defrance.org>. doi: 10.4267/2042/61628.
- Van Berlo, D., Albrecht, C., Knaapen, A. M., Cassee, F. R., Gerlofs-Nijland, M. E., Kooter, I. M., ... Schins, R. P. F. (2010). Comparative evaluation of the effects of short-term inhalation exposure to diesel engine exhaust on rat lung and brain. *Archives of Toxicology*, 84(7), 553–562. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0551-7>
- Vanderwolf, C. H. (1988). Cerebral activity and behavior: Control by central cholinergic and serotonergic systems. *International Review of Neurobiology*, 30(C), 225–340. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60050-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60050-1)
- Vassar R, Ngai J, Axel R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*. 74: 309-318.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R. (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79: 981-91.
- Veras, M. M., Damaceno-Rodrigues, N. R., Caldini, E. G., Ribeiro, A. A. C. M., Mayhew, T. M., Saldiva, P. H. N., & Dolhnikoff, M. (2008). Particulate Urban Air Pollution Affects the Functional Morphology of Mouse Placenta. *Biology of Reproduction*, 79(3), 578–584. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069591>
- Veronesi, B., Makwana, O., Pooler, M., & Chen, L. C. (2005). Effects of Subchronic Exposures to Concentrated Ambient Particles: VII. Degeneration of Dopaminergic Neurons in Apo E^{-/-} Mice. *Inhalation Toxicology*, 17(4-5), 235–241. doi:10.1080/08958370590912888
- Volk, H. E., Lurmann, F., Penfold, B., Hertz-Picciotto, I., & McConnell, R. (2013). Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry*, 70(1), 71–77. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.266>

- Vorhees, CV. and Williams, MT. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858. doi:10.1038/nprot.2006.116.
- Wachowiak, M., & Shipley, M. T. (2006). Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(4), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.04.007>
- Walker, B Jr. (2005). Pediatric environmental health. *J Natl Med Assoc*. 97, 262–269.
- Wang F., Nemes A., Mendelsohn M. and Axel R. (1998). Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*. 93: 47-60.
- Wang, WZ., Oeschger, FM., Montiel, JF., García-Moreno, F., Hoerder-Suabedissen, A., Krubitzer, L., Ek, CJ., Saunders, NR., Reim, K., Villalón, A. and Molnár, Z. (2011). Comparative Aspects of Subplate Zone Studied with Gene Expression in Sauropsids and Mammals. *Cerebral Cortex*. 21(10), 2187–2203. doi:10.1093/cercor/bhq278.
- Westerholm, R., & Egeback, K. E. (1994). Exhaust emissions from light- and heavy-duty vehicles: Chemical composition, impact of exhaust after treatment, and fuel parameters. *Environmental Health Perspectives*, 102(SUPPL. 4), 13–23. <https://doi.org/10.2307/3431926>
- Whitman, MC. and Greer, CA. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol*. 89:162-175. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.07.003.
- WHO. (2006). Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. *WHO*. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(88\)90109-6](https://doi.org/10.1016/0004-6981(88)90109-6)
- WHO. (2013). Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project: Technical Report, World Health Organisation, Copenhagen, Denmark. Retrieved from http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/193108/REVIHAAP-Final-technical-report-final-version.pdf.
- WHO. (2014). Burden of disease from Household Air Pollution for 2012. *WHO*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61766-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61766-8).Smith
- WHO. (2016). Ambient air pollution: a global assessment of exposure and burden of disease. *WHO*. ISBN: 9789241511353.
- WHO. (2018). Exposure to ambient air pollution from particulate matter for 2016. apps.who.int/gho/data/node.sdg.11-6
- Wichmann, H. E. (2007). Diesel exhaust particles. *Inhalation Toxicology*, 19(SUPPL. 1), 241–244. <https://doi.org/10.1080/08958370701498075>
- Willhite, D. C., Nguyen, K. T., Masurkar, A. V., Greer, C. A., Shepherd, G. M., & Chen, W. R. (2006). Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12592–12597. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602032103>
- Williams RL. and Chock DP. (1981). Characterization of diesel particulate exposure. *Environment International*, 5(4–6), 199–209. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L12056523>
- Win-Shwe, TT., Yamamoto, S., Fujitani, Y., Hirano, S. and Fujimaki, H. (2008). Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust. *NeuroToxicology*. 29(6), 940–947. doi:10.1016/j.neuro.2008.09.007
- Win-Shwe, T. T., and Fujimaki, H. (2011). Nanoparticles and Neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 6267–6280. <https://doi.org/10.3390/ijms12096267>
- Win-Shwe, T.-T., Fujimaki, H., Fujitani, Y., & Hirano, S. (2012). Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 262(3), 355–362. doi:10.1016/j.taap.2012.05.015
- Winter, JD., Dorner, S., Lukovic, J., Fisher, JA., St. Lawrence, KS. and Kassner, A. (2011). Noninvasive MRI Measures of Microstructural and Cerebrovascular Changes During Normal Swine Brain Development. *Pediatric Research*. 69(5 Part 1), 418–424. doi:10.1203/pdr.0b013e3182110f7e
- Wong-riley T, M. T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity, (3).

- Wong, C. T., Wais, J., & Crawford, D. A. (2015). Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing Autism Spectrum Disorders. *The European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13028>
- World Health Organization. (2013). Review of evidence on health aspects of air pollution – REVIHAAP Project, 309. Retrieved from <http://www.euro.who.int/en/health-topics/environment-and-health/air-quality/publications/2013/review-of-evidence-on-health-aspects-of-air-pollution-revihaap-project-final-technical-report>
- Xing, Y. F., Xu, Y. H., Shi, M. H., & Lian, Y. X. (2016). The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system. *Journal of Thoracic Disease*, 8(1), E69–E74. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19>
- Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., ... Itoh, N. (2011). Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nature Nanotechnology*, 6(5), 321–328. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.41>
- Yokel, R.A. (2016). Physicochemical properties of engineered nanomaterials that influence their nervous system distribution and effects. *Nanomedicine*. 12, 2081–2093. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.007>
- Yokoi, M., Mori, K. and Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11;92(8):3371-5. DOI: 10.1073/pnas.92.8.3371.
- Yokota, S., Mizuo, K., Moriya, N., Oshio, S., Sugawara, I., & Takeda, K. (2009). Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neuroscience Letters*, 449(1), 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.085>
- Yokota, S., Takashima, H., Ohta, R., Saito, Y., Miyahara, T., Yoshida, Y., ... Fujimaki, H. (2011). Nasal instillation of nanoparticle-rich diesel exhaust particles slightly affects emotional behavior and learning capability in rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36(3), 267–276. doi:10.2131/jts.36.267
- Yokota, S., Moriya, N., Iwata, M., Umezawa, M., Oshio, S., & Takeda, K. K. (2013). Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *Journal of Toxicological Sciences*, 38(1), 13–23. <https://doi.org/10.2131/jts.38.13>
- Yokota, S., Sato, A., Umezawa, M., Oshio, S., & Takeda, K. (2015). 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*, 50, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.009>
- Yokota, S., Oshio, S., & Takeda, K. (2016). In utero exposure to diesel exhaust particles induces anxiogenic effects on male offspring via chronic activation of serotonergic neuron in dorsal raphe nucleus, 41(5), 583–593.
- Yoshizaki, K., Brito, J. M., Moriya, H. T., Toledo, A. C., Ferzilan, S., Ligeiro de Oliveira, A. P., ... Macchione, M. (2015). Chronic exposure of diesel exhaust particles induces alveolar enlargement in mice. *Respiratory Research*, 16(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12931-015-0172-z>
- Yu, W. J., Son, J. M., Lee, J., Kim, S. H., Lee, I. C., Baek, H. S., ... Kim, J. C. (2014). Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology*, 8(SUPPL. 1), 85–91. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.857734>
- Zhou Y, Zheng W, Liu W, Wang C, Zhan Y, Li H, Chen L, N. Y. (2018). Cross-sectional relationship between kynurenine pathway metabolites and cognitive function in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.11.001>
- Zou, D.-J., Chesler, A. and Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story?. *Nat. Rev. Neurosci*. 10, 611–618. doi:10.1038/nrn2666.

