

Table des matières

Page de titres	
Liste du corps enseignant	
Remerciements	
Table des matières.....	p.1
Introduction.....	p.5
Première partie : effet de l'exposition au plomb sur le développement des fonctions cognitives et comportementales.....	p.7
I – Les enfants, cible privilégiée de l'intoxication chronique au plomb.....	p.9
1 – Toxicité du plomb chez l'enfant : d'hier à aujourd'hui.	
A – Une toxicité reconnue depuis l'Antiquité.	
B – Existe-t-il un seuil à la toxicité du plomb chez l'enfant ?.....	p.10
2 – Epidémiologie du saturnisme infantile.....	p.11
A – Les principales sources d'exposition au plomb.	
B – Réalité de l'exposition au plomb.....	p.12
C – Modalités de l'exposition chronique au plomb pendant la gestation et la lactation, périodes critiques du neurodéveloppement.....	p.13
II – Effet d'une exposition de faible concentration au plomb sur les fonctions cognitives de l'enfant.....	p.15
1 – Résultats des études épidémiologiques et comportementales.	
A – Etudes cas-contrôles et études à éléments croisés.	
B – Etudes prospectives.....	p.18
C – Persistance et dynamique des effets du plomb.....	p.21
2 – Problèmes méthodologiques rencontrés dans ces études.....	p.23
A – Mesure de l'exposition au plomb.	
B – Echantillonnage.	
C – Mesure des effets cognitifs et comportementaux.	
D – Mesure de l'attention et du comportement en classe et à domicile.....	p.24
E – Contrôle des cofacteurs.	

III – Conséquences d’une exposition chronique au plomb sur le développement cognitif et comportemental dans les modèles animaux..p.27

- 1 – Altération par le plomb de différents aspects des processus d’apprentissage.
 - A – Incidence de l’exposition au plomb sur l’apprentissage spatial.
 - B – Mise en évidence d’un déficit d’attention et / ou d’un comportement d’obstination.....p.28
 - C – Altération par le plomb des capacités associatives.....p.31
- 2 – Périodes vulnérables et persistance du déficit.....p.32
 - A – Persistance du déficit.
 - B – Existe-t-il des périodes de plus forte vulnérabilité au plomb ?.....p.34

Deuxième partie : les mécanismes moléculaires à la base de la mémoire : des cibles potentielles pour le plomb.....p.35

I – Vers une définition moléculaire du stockage de la mémoire.....p.36

- 1 – Mémoire implicite : le stockage de la mémoire réside dans la plasticité des synapses.....p.37
- 2 – Mémoire explicite ou non-déclarative.....p.39
 - A – LTP dans la voie des fibres moussues.....p.41
 - B – LTP dans la voie collatérale de Schaffer.
 - C – LTD, l’autre face de LTP.....p.43
 - D – De la mémoire à court-terme à la mémoire à long-terme.....p.44
 - E – Conclusion.....p.47

II – Incidence d’une exposition précoce au plomb sur les mécanismes à la base de l’apprentissage et de la mémoire.....p.49

- 1 – Conséquences d’une exposition au plomb sur LTP.
- 2 – Conséquences d’une exposition au plomb sur LTD.....p.52
- 3 – Conclusion sur les effets du plomb sur LTP et LTD.....p.53
- 4 – Quelques mécanismes pouvant expliquer les effets du plomb sur LTP et LTD.....p.54
 - A – Modulation par le plomb de la libération du glutamate.
 - B – Modulation par le plomb de l’activité de PKC.....p.56
 - C – Action du plomb sur les récepteurs NMDA.....p.58

Troisième partie : revue des mécanismes d’action potentiels du plomb sur le fonctionnement du système nerveux central.....p.63

I – Interactions entre une exposition chronique au plomb pendant le développement et la morphologie du système nerveux central.....p.65

- 1 – Altération par le plomb de la cytoarchitecture du cerveau.
 - A – Revue des effets du plomb sur le développement morphologique des neurones.
 - B – L’exposition précoce au plomb est à l’origine d’un déficit d’innervation cholinergique de l’hippocampe.....p.66
 - C – L’exposition précoce au plomb est à l’origine d’un déficit neuroplastique.....p.70

2 – En modulant l'expression de certains gènes clés, le plomb perturbe la synchronisation de la croissance et du développement cellulaire dans le cerveau.....	p.71
A – Modulation par le plomb de l'expression de gènes impliqués dans le développement cérébral.....	p.72
B – Altération par le plomb des mécanismes de liaison à l'ADN des ZFP...	p.74
C – Action synergique du plomb et de NGF sur la croissance des neurites via la potentialisation de la voie des ERK/MAPK.....	p.76
3 – Cytotoxicité du plomb.....	p.77
A – Mécanismes d'action du plomb pouvant expliquer sa cytotoxicité.	
B – Conséquence de ces modifications induites par le plomb sur les cellules neuronales et gliales.....	p.79
 II – Le plomb perturbe la biologie des cellules nerveuses par ses actions sur les systèmes de communication cellulaire.....	p.81
1 – Perturbation par le plomb du système des neurotransmetteurs.....	p.82
A – Plomb et système cholinergique.	
B – Plomb et transmission glutamatergique.....	p.83
C – Plomb et système dopaminergique.....	p.84
2 – Interférences du plomb avec le systèmes des seconds messagers par la remise en cause du métabolisme du calcium.....	p.85
A – Les multiples facettes des relations plomb-calcium.....	p.86
B – Modulation par le plomb du métabolisme de l'AMPc.	
C – Le plomb perturbe la transduction de signal assurée par PKC.....	p.87
3 – L'exposition au plomb interfère avec l'expression des gènes et l'intégrité de l'ADN.....	p.88
A – Perturbation par le plomb du système des troisièmes messagers : les facteurs de transcription.	
B – Interaction du plomb avec l'expression de certains gènes.....	p.89
C – Le plomb peut porter atteinte à l'intégrité de l'ADN.....	p.90
 Conclusion.....	p.91
 Bibliographie.....	p.95
Glossaire des abréviations utilisées.....	p.103

Introduction

Il est toujours désespérant de découvrir à la une des journaux que dans leur course à la productivité et à l'efficacité, les Hommes ont préféré ignorer ou bien n'ont pas pris conscience que leurs actes entraînaient l'émergence de nouvelles pollutions environnementales. Comment supporter en effet que l'air que l'on respire, l'eau que l'on boit ou la nourriture que l'on mange puissent insidieusement altérer notre santé, comme ce fut le cas pour l'amiante, les pesticides, les hormones, la dioxine et peut-être les OGM ?

Malgré la crainte que nous inspirent tous ces nouveaux dangers, il ne faut cependant pas oublier l'existence d'un toxique reconnu comme tel depuis l'Antiquité et qui pourtant nous menace toujours : le plomb !

En effet, si les cas de saturnisme aigu ont quasiment disparu, il est pourtant devenu évident que les taux de plomb plus modérés actuellement relevés sur la planète sont aujourd'hui encore responsables de pathologies plus subtiles mais néanmoins inacceptables. Une exposition chronique modérée au plomb peut en effet occasionner une altération des tubules rénaux, des taux de protoporphyrine et, plus grave encore, de notre « intelligence ».

Ce dernier point est particulièrement préoccupant puisqu'il apparaît qu'une exposition chronique au plomb puisse altérer le comportement ainsi que les facultés d'apprentissage et de mémorisation des enfants, qui semblent être les cibles privilégiées de ce toxique aux taux de plomb actuellement rencontrés.

La gravité de ce constat a suscité de nombreux travaux sur les différents aspects de la neurotoxicité du plomb au cours du développement. Ces travaux ayant débuté vers le milieu des années 70 et se poursuivant encore, il est apparu opportun de dresser un bilan général de l'état actuel des connaissances à ce sujet.

Tout d'abord, après avoir mis en évidence l'existence d'une réelle contamination de l'environnement par le plomb, on s'attachera à montrer de quelle manière les enfants, cibles plus vulnérables et plus exposées au plomb, sont touchés dans leurs capacités cognitives et leur comportement, ces effets étant ensuite précisés à l'aide d'expérimentations sur des modèles animaux.

Ensuite, afin de mieux comprendre l'altération par le plomb de l'apprentissage et de la mémoire, seront exposés les mécanismes moléculaires sur lesquels reposent ces processus. On pourra alors mesurer l'importance des effets du plomb sur ces principaux mécanismes, offrant ainsi une explication partielle à la neurotoxicité du plomb.

Enfin, l'ensemble des interactions du plomb avec l'organisation et le fonctionnement du système nerveux central seront évoquées. Cela permettra d'analyser de quelle manière une exposition chronique précoce au plomb environnemental peut altérer la morphologie et le développement du système nerveux central, et comment il perturbe la communication cellulaire à différents niveaux.

Première partie

**EFFET DE L'EXPOSITION AU
PLOMB SUR LE DEVELOPPEMENT
DES FONCTIONS COGNITIVES ET
COMPORTEMENTALES**

I - Les enfants : cible privilégiée de l'intoxication chronique au plomb

Bien que connue depuis l'antiquité, la neurotoxicité du plomb reste un problème d'actualité du fait de l'omniprésence de ce métal, toxique même à de très faibles doses, dans notre environnement. De plus, il s'avère que les sujets les plus vulnérables sont les enfants, à la fois plus sensibles et plus exposés.

1 – Toxicité du plomb chez l'enfant : d'hier à aujourd'hui

A – Une toxicité reconnue depuis l'Antiquité

Les archives montrent que le plomb a été utilisé par l'homme depuis environ 5000 ans et il continue à avoir de nombreux usages dans la technologie moderne. Les historiens médicaux ont trouvé des preuves d'empoisonnement au plomb depuis des siècles. Par exemple, au cours du déclin de l'Empire Romain, quand le plomb était utilisé pour les canalisations d'eau et les cuves de stockage du vin, des textes impliquent le plomb dans une épidémie de mort-nés et de fausses couches.

Les symptômes de l'empoisonnement au plomb (saturnisme) ont été rapportés pendant des siècles en Europe, bien que sa toxicité ne soit pas universellement reconnue, des médecins chinois, arabes et européens l'utilisant comme remède jusqu'au 19^{ème} siècle. Les ouvriers des fonderies de plomb étaient connus pour souffrir de coliques et de faiblesse, mais les risques pour le reste de la population étaient généralement méconnus, bien que certains scientifiques du 18^{ème} siècle, dont Benjamin Franklin, préconisèrent précocement un contrôle du plomb.

Le danger des peintures au plomb pour les enfants fut reconnu dès 1891, quand une épidémie de néphrites et de symptômes neurologiques parmi des enfants du Queensland en Australie fut reliée à leur habitude de boire de l'eau qui dégouttait de vérandas peintes en blanc. Cependant ces avertissements sporadiques ne se traduisirent par aucun aménagement de l'utilisation du plomb pendant de nombreuses années.

Les cas sévères de saturnisme chez l'enfant peuvent pourtant provoquer un oedème du cerveau (encéphalopathie), suivi de coma, convulsions et mort ; et anémie, néphrite et douleurs abdominales sont depuis longtemps reconnues comme symptômes d'empoisonnement au plomb. Mais il faut attendre un article de Byers et Lord en 1943 pour y associer l'échec scolaire et des problèmes de comportement.

B – Existe-t-il un seuil à la toxicité du plomb chez l'enfant ?

Un thème récurrent dans la recherche sur l'intoxication des enfants au plomb a été la découverte répétée depuis les 40 dernières années que le plomb est toxique pour le système nerveux en développement à des taux qui étaient précédemment considérés comme sûrs (Landrigan, 2000).

Depuis 1960, le plomb est devenu un problème majeur de santé publique et pour la première fois fut posé un seuil de toxicité, défini comme une concentration de plomb dans le sang total supérieure à 60 µg/dl. Les effets du plomb sur les enfants étaient alors considérés de manière simple : ou bien l'enfant montrait des signes cliniques d'empoisonnement ou bien il allait bien. Puis, débutant dans les années 70 avec les travaux d'Herbert Needleman, la conviction grandit que le plomb pouvait réduire l'intelligence des enfants et altérer leur comportement à des plombémies inférieures à 60 µg/dl, c'est à dire à des niveaux insuffisants pour produire des symptômes évidents. Ainsi naquit le concept d'empoisonnement subclinique au plomb, basé sur la compréhension du fait que le plomb produit un spectre de toxicité dans lequel les symptômes cliniques comme l'encéphalopathie, l'insuffisance rénale et l'anémie avaient leurs contreparties subcliniques dans une intelligence amoindrie, un fonctionnement altéré des tubules rénaux et des taux élevés de protoporphyrine.

Les explorations qui suivirent sur la toxicité subclinique du plomb utilisant des outils analytiques de plus en plus pointus montrèrent que le plomb était toxique chez l'enfant à des taux toujours plus bas, ce qui amena à réduire constamment la concentration de plomb dans le sang qui définissait le saturnisme. Ainsi, aux Etats-Unis, ce taux fut réduit à 40 µg/dl en 1971, à 30 µg/dl en 1978 et à 25 µg/dl en 1985. Plus récemment, en 1991, le taux fut réduit à 10 µg/dl. Cette dernière modification fut apportée suite à la démonstration dans de multiples études épidémiologiques que des expositions prénatales au plomb pouvaient avoir des effets négatifs sur le développement neurocomportemental chez les jeunes enfants pour des plombémies allant de 10 à 20 µg/dl. Cependant, même ce seuil si bas paraît devoir être remis en question par les récents travaux de Lanphear et al. (2000). Après avoir analysé les données venant de plus de 4800 enfants de 6 à 16 ans ayant participé à la troisième enquête nationale de santé et de nutrition américaine, il trouva une corrélation négative entre la plombémie et les performances en lecture et mathématiques chez des enfants dont la plombémie n'excédait pas 5 µg/dl.

Ce résultat selon lequel le plomb est toxique pour l'enfant même à des niveaux excessivement bas doit alerter la vigilance des services publics et suggère qu'il n'y ait pas de seuil de sécurité concernant la toxicité du plomb dans le système nerveux central.

2 – Epidémiologie du saturnisme infantile

A – Les principales sources d'exposition au plomb

On trouve du plomb dans l'air, les sols, l'eau, les aliments et la poussière ; les apports individuels varient en fonction de l'environnement et de l'âge (Kremp et Barbier, 2001). Le plomb est utilisé depuis l'Antiquité pour la monnaie et les soudures, depuis la fin du 19^{ème} siècle dans les peintures et depuis les années 1960, comme additif dans l'essence. Les études réalisées dans la calotte glaciaire du Groenland montrent une croissance régulière des concentrations en plomb, avec une augmentation brutale au cours du siècle dernier. La concentration moyenne dans les glaces en 1520 était de 4 pg/g, elle est passée à 100 pg/g entre 1930 et 1990 (INSERM, 1999). La constatation des effets toxiques du plomb a progressivement amené les états industriels à en limiter l'utilisation et à ériger des normes de plus en plus strictes pour les teneurs autorisées, notamment dans l'air et dans l'eau.

Dans l'air, encore actuellement, la principale source de plomb est l'essence. En 1994, la France était encore le troisième pays européen émetteur de plomb dans l'environnement, dont 83.7 % lié au trafic automobile. Si les Etats-Unis ont interdit l'adjonction de plomb dans l'essence pour tous les véhicules à partir de 1975, la France a été beaucoup plus lente et, en 1997, la proportion de carburants au plomb était encore de 50 %. La recommandation européenne d'une valeur limite de plomb dans l'essence n'a été adoptée qu'en 1991 et les pots catalytiques ne sont obligatoires que depuis 1993. On voit dans tous les pays qui ont adopté de telles mesures les plombémies moyennes des populations baisser en parallèle avec la diminution du plomb dans l'essence.

La pollution industrielle est dans certaines régions une source non négligeable, et le plomb émis par les usines (fonderies de métaux non ferreux, installations sidérurgiques) contamine pour longtemps la terre des jardins et la poussière des maisons. Les installations sont réglementées en France depuis 1976.

La toxicité des peintures au plomb est connue depuis longtemps. Bon marché, antifongiques et bons isolants contre l'humidité, elles furent très largement utilisées jusqu'à leur interdiction en 1948. Elles s'effritent et se délitent en 50 ans environ. Réduites en poussières, sucrées, elles vont être particulièrement accessibles aux jeunes enfants. **Leur activité au ras du sol, leur important comportement d'oralité, l'absorption digestive du plomb cinq fois plus importante que chez l'adulte vont faire de ces jeunes enfants la cible privilégiée du saturnisme.** C'est dans les immeubles les plus dégradés, les appartements les plus insalubres, habités par des familles précarisées, que le risque est le plus élevé (Cheymol, 1999). Ces peintures ne sont interdites à la vente en France que depuis 1993.

L'eau peut être contaminée par passage dans des canalisations en plomb. L'enrichissement est variable selon le degré d'acidité et d'agressivité de l'eau. L'utilisation du plomb est interdite depuis 1995 pour les canalisations et depuis 1998 pour les brasures. Le remplacement est obligatoire dans les conduites du réseau public, et est vivement conseillé pour les conduites privées. La nouvelle norme

européenne fixe la teneur maximale en plomb dans l'eau à 10 µg/l, et les états ont jusqu'en 2013 pour se mettre en conformité.

L'alimentation peut être contaminée par l'eau et par différents contenants (céramique, poterie, étains, cristaux, plombs de chasse). L'OMS a fixé une dose journalière tolérable de 3.5 µg/kg. On considère que la plombémie augmente à partir d'apports de 5 µg/kg/j. Le contrôle du plomb dans les aliments s'est renforcé depuis 1998, avec des plans de surveillance spécifiques dépendants de différents ministères.

Aux Etats-Unis, où le plomb atmosphérique semble devenu très réduit, les facteurs prédictifs d'une plombémie élevée chez l'enfant sont, par ordre décroissant, la charge en plomb dans les poussières de maison, la teneur en plomb du sol voisin, l'âge des enfants, leur comportement main-bouche et leur catégorie sociale (Kremp et Barbier, 2001).

B – Réalité de l'exposition au plomb

Considérant tous ces facteurs dans leur ensemble, il semble opportun de dresser un bilan des risques concrets de saturnisme. Le plus frappant est alors la disparité qui existe entre les pays et qui reflète leur niveau de développement et leur perception plus ou moins tardive de ce problème. Parmi les pays les plus en avance dans ce domaine, les Etats-Unis sont sans conteste les leaders, ayant les premiers pris en compte la toxicité du plomb et mis en œuvre les mesures pour y faire face. Ils ont ainsi réduit la plombémie moyenne de 90 % entre 1976 et 1996. Il existe cependant près d'un million d'enfants américains dont la plombémie est supérieure à 10 µg/dl et des millions d'autres dont la plombémie est comprise entre 2.5 et 10 µg/dl (Landrigan, 2000).

La situation est encore moins bonne en France où la perception de ce phénomène a été plus tardive et où, malgré une série de lois récentes à ce sujet, il n'existe toujours pas de décret d'application fixant le seuil de déclaration (Berthier, 2001). De plus, le dispositif expérimental mis en place en 1992 n'a permis d'effectuer des dosages que chez 14000 enfants environ entre 1992 et 1997 et, parmi ceux qui avaient été dépistés comme positifs, beaucoup ont été perdus de vue. L'INSERM a ainsi estimé que 5 % seulement des enfants intoxiqués avaient été identifiés. **D'autres études conduisent à penser qu'environ 2 % des enfants français de 1 à 6 ans auraient une plombémie supérieure à 10 µg/dl !**

La question du saturnisme est bien sûr plus préoccupante encore dans les pays nouvellement industrialisés où les problèmes d'environnement sont moins pris en compte. C'est le cas par exemple de la Chine, pour laquelle bien que des données globales concernant la prévalence du saturnisme ne soient pas disponibles, une vingtaine d'études ont montré que ce problème s'était rapidement étendu du fait de l'industrialisation rapide et de l'utilisation massive de conduites en plomb. Les enfants résidant dans des zones industrielles ou de trafic ont ainsi des plombémies allant de 21.8 à 67.9 µg/dl. Même dans le cas des enfants dits « non exposés », 50 % d'entre eux ont des plombémies supérieures à 10 µg/dl (Shen et al., 2001). On peut supposer à juste titre que ces chiffres alarmants ne sont pas l'apanage de la Chine et que la situation est identique dans tous les pays émergents.

C – Modalités de l'exposition chronique au plomb pendant la gestation et la lactation, période critique du neurodéveloppement

L'exposition au plomb peut commencer *in utero*. La contamination peut bien sûr se faire via l'air, l'eau et les aliments souillés ingérés par la mère. Mais les découvertes scientifiques concernant le devenir du plomb dans l'organisme humain constituent un autre sujet d'inquiétude. En effet, le plomb osseux représente 90 % du plomb stocké dans l'organisme avec une demi-vie de 10 à 20 ans, et **durant la grossesse, on observe une augmentation de la plombémie par mobilisation de ce plomb osseux accumulé depuis l'enfance**. L'utilisation d'isotopes stables du plomb chez des guenons gestantes a permis de confirmer ce phénomène : jusqu'à 39 % du plomb du squelette fœtal provenait du squelette de la mère, le taux de plomb osseux du fœtus dépassant le plus souvent le taux osseux maternel de 150 % en moyenne (Franklin et al., 1997).

La mobilisation du plomb osseux durant la lactation semble être supérieure encore à celle observée durant la grossesse, ce qui explique que l'essentiel du plomb sanguin des enfants allaités peut provenir du squelette de la mère. Nous nous trouvons alors confronté à un problème de transmission intergénérationnelle du saturnisme.

Par ailleurs, des études ont montré qu'une exposition continue des mères était encore plus préjudiciable. Le transfert du plomb par le placenta et l'allaitement a pour cela été étudié chez de jeunes rats dont la mère avait été exposée au plomb depuis 8 semaines avant l'accouplement jusqu'à la naissance ou jusqu'au 15^{ème} jour de lactation (Hallen et al., 1995). Au 15^{ème} jour, il apparaît que la concentration de plomb dans le sang et dans le cerveau est 6 fois plus importante chez les jeunes exposés en continu que chez ceux exposés seulement pendant la gestation. De plus, la plombémie des jeunes exposés seulement pendant la lactation est bien supérieure à celle des jeunes exposés seulement pendant la gestation (Hallen et al., 1995). Cela indique que **le transfert par l'allaitement après une exposition récente ou en cours des mères au plomb est considérablement supérieur au transfert par le placenta**.

De plus, alors que lors d'une exposition continue la concentration de plomb dans le lait au 15^{ème} jour est 2.5 fois supérieure à celle du sang, elle devient égale à la plombémie quand l'exposition prend fin à la mise-bas et ne correspond plus qu'à 10% de la concentration notée après une exposition continue (Hallen et al., 1995). Cette observation met en évidence l'importante excrétion du plomb dans le lait, qui diminue rapidement à l'arrêt de l'exposition.

Cette exposition précoce au plomb via le placenta et l'allaitement est d'autant plus grave que la barrière hémato-méningée est immature et hautement perméable dans les premiers stades du développement cérébral. Bien que sa formation soit quasiment achevée à la naissance, la barrière est fonctionnellement immature et dans certaines espèces le reste un long moment encore. Une exposition chimique au cours du jeune âge peut avoir de profondes conséquences neurotoxiques. En effet, pendant le développement précoce, la structure perméable de la barrière hémato-méningée permet de fournir au cerveau en croissance une quantité optimale de nutriments véhiculés par le sang. Cependant,

cette relative ouverture de la barrière rend le cerveau plus vulnérable à l'action de substances toxiques dont le plomb (Zheng, 2001). Il semblerait que les astrocytes, dont les pseudopodes enserrant les micro vaisseaux du cerveau, soient les premiers touchés, exposant alors les cellules endothéliales des micro vaisseaux, d'où une rupture de la barrière hémato-méningée. Ce phénomène est bien sûr plus préoccupant encore dans les premiers stades de développement où cette dernière n'est pas encore totalement fonctionnelle.

Les périodes clés du développement du système nerveux sont particulièrement sensibles aux agressions de l'environnement car elles dépendent de l'émergence temporelle et régionale des processus critiques que sont la prolifération, la migration, la différenciation, la synaptogénèse, la myélination, et l'apoptose. De nombreuses études montrent que le développement neural s'étend du stade embryonnaire jusqu'à l'adolescence. En général, la séquence d'événements est la même qu'elle que soit l'espèce, bien que l'échelle de temps soit considérablement différente. L'exposition pendant le développement des animaux ou des hommes à de nombreux agents (rayons-X, éthanol, méthyl-mercure, plomb...) prouve qu'une interférence avec un ou plusieurs de ces processus de développement peut conduire à une neurotoxicité du développement (Rice et Barone, 2000). Cette plus forte vulnérabilité des enfants ou des animaux d'expérience en développement est un thème récurrent des études décrites ici, et peut s'expliquer par le fait que c'est pendant cette phase critique du développement cérébral que les enfants sont les plus exposés et que la perméabilité de la barrière hémato-méningée au plomb est la plus importante.

Le plomb, contaminant environnemental universellement présent bien qu'à des degrés divers dans tous les pays industrialisés ou en passe de l'être, a donc pour cible principale les enfants. Ces derniers sont non seulement davantage exposés que les adultes du fait du relargage du plomb osseux maternel pendant la gestation et la lactation puis de leur comportement d'oralité, alors que leurs barrières digestives et hémato-méningée ne sont pas complètement matures, mais ils sont aussi des cibles plus sensibles au plomb en raison de la vulnérabilité des processus du développement cérébral chez l'embryon et l'enfant.

C'est pourquoi du fait de cette exposition et de cette vulnérabilité spécifiques, les chercheurs ont cherché à savoir quelles étaient les conséquences d'une exposition chronique au plomb sur le développement des fonctions cognitives et comportementales des enfants.

II – Conséquences d'une exposition de faible concentration au plomb sur les fonctions cognitives de l'enfant

1 – Résultats des études épidémiologiques et comportementales

A – Etudes cas-contrôle et études à éléments croisés

Avec l'avènement du dépistage des communautés exposées au plomb, débuta une recherche systématique sur les effets du plomb chez les enfants exposés mais ne présentant pas de signes d'intoxication aiguë. Ces études utilisèrent typiquement des méthodes de cas contrôles : appariement, selon des variables que les chercheurs jugeaient pertinentes, d'un enfant avec un taux de plomb donné avec un enfant « contrôle ». Les troubles majeurs examinés, rapportés par Bellinger et Stiles (1993) furent l'hyperactivité (David et al., 1972*, 1977*), l'incapacité à apprendre (Solomon, 1979*), le retard mental (Moore et al., 1977*) et autres troubles neuropsychiatriques (Gilberg et al., 1982*). Cependant, il fut très difficile d'identifier de réels enfants contrôles et d'obtenir un historique complet et valide de l'exposition au plomb des enfants.

Les études qui suivirent, dites à éléments croisés, reposèrent sur des enfants regroupés selon leur niveau d'exposition au plomb et comparés en terme de conséquences sur leurs index de développement et de comportement.

Une des premières études conséquentes visant à tester une population ne présentant pas de symptômes patents d'empoisonnement au plomb fut réalisée par Needleman et al. (1979*), la teneur en plomb des dents servant d'indicateur d'une exposition prolongée au plomb (Banks et al., 19997). Les paramètres évalués furent le développement de l'intelligence et du langage, l'attention et le comportement en classe. Des interviews des parents furent menées afin d'identifier les covariables liées significativement à l'exposition au plomb, comme le statut socio-économique des parents, leur niveau d'éducation et leur âge à la naissance de l'enfant. Cette étude conclut à l'altération par le plomb du quotient intellectuel (QI) et de l'adaptabilité des enfants. De nombreuses critiques furent formulées sur la validité des informations ainsi rapportées, mais cette étude servit cependant de modèle à la plupart des recherches qui suivirent et qui conclurent à une tendance du plomb à détériorer le fonctionnement cognitif, tout en soulevant le problème d'une possible confusion avec l'influence de la classe sociale et d'autres caractéristiques familiales.

Dans tous ces travaux, une pléthore de tests servit à mesurer l'incidence neurocomportementale de l'exposition précoce au plomb. Les caractéristiques des tests les plus fréquemment utilisés sont répertoriées dans le tableau I.

Tableau I : Descriptif des principaux tests neurocomportementaux utilisés lors des études épidémiologiques.

Tests d'évaluation neurocomportementale utilisés.	Capacités évaluées par ce test.
Wechsler Intelligence Scales for Children (WISC)	Mesures globales d'intelligence psychométrique. (WISC-R = WISC- Révisé)
Wechsler Preschool and Primary Scales of Intelligence (WPPSI)	Mesures globales d'intelligence psychométrique adaptées aux jeunes enfants.
Needleman Scales	Evaluation du comportement.
McCarthy Scales (5 à 9 ans)	Index Général Cognitif (GCI), quantifié par des sous-échelles mesurant les performances quantitatives verbales et perceptuelles ainsi que la mémoire et la motricité.
Bayley Scales of Infant Development (< 2.5 ans)	Index de Développement Mental (MDI) : comportement linguistique, relations spatio-visuelles, coordination sensori-motrices, mémoire. Index de Développement Psychomoteur (PDI) : capacités motrices fines et grossières.
Kaufman Assessment Battery for Children (K -ABC)	Mesures globales d'intelligence chez les enfants de plus de 4 ans.
Child Behavior Checklist (CBC)	Somme de tests mesurant le comportement, le tempérament et l'émotivité.
Bender Gestalt Test	Performances sensori-motrices (dont capacités d'intégration visuelles et motrices via un test de construction).
Trail Making Test (TMT)	Intégration visuelle et motrice.
Vienna Reaction Device (VRD)	Réactivité.

Sources: informations recueillies dans les différents articles ayant servi à l'élaboration de la partie II – 1.

En 1990, Winneke, qui conduisit de nombreux travaux sur le sujet, fut appelé par l'OMS à coordonner une vaste étude multi-centres, regroupant les données recueillies dans huit pays européens et rapportées dans le tableau II (Winneke, 1996).

Tableau II : Principaux résultats de l'étude européenne multi-centres.

Neurocomportement évalué	Nombre d'enfants	Pente de régression	Valeur significative de t	% Variance expliquée par Pb
WISC	1698	0.53	-1.62*	0.19%
Bender Gestalt-Test	698	1.64	2.17**	0.31%
Performance des réactions	971	0.15	1.68**	0.37%
Temps de réaction ¹⁾	986	0.01	0.41	0.20%
Comportement selon les enseignants (Needleman-Scales) ²⁾	1012	-0.00	-0.03	0.00%

- $p < 0.1$; ** $p < 0.05$
- 1) log msec ; 2) somme de 6 valeurs.

Source : G. Winneke / *Neurotoxicology* 17 (1996) 565-580.

Cette vaste étude porta sur 1879 écoliers, dont les plombémies allaient de moins de 5 à 60 $\mu\text{g/dl}$. Les tests psychologiques et comportementaux comprenaient le Wechsler Intelligence Scales for Children (WISC) mesurant l'intelligence psychométrique, le Bender Gestalt test et le trail-making test (TMT) pour l'intégration visuelle et motrice, le Vienna Reaction Device (VRD) et un test de temps de réaction ralenti pour les performances de réactivité, ainsi que l'échelle de comportement de Needleman. Des analyses étude par étude ainsi qu'une analyse totale à régression multiple sur l'ensemble des données furent réalisées. Les résultats de cette dernière, contenus dans le tableau II peuvent être résumés comme suit :

- Une faible corrélation négative, à la limite de la signification statistique, existe entre l'intelligence psychométrique et la plombémie. Une augmentation de la plombémie de 5 à 50 $\mu\text{g/dl}$ ne diminue le QI que d'environ 5 points.
- Des corrélations plus fortes et statistiquement significatives ont été trouvées entre l'exposition au plomb et la dégradation de l'intégration visuelle et motrice, et les performances de réaction.

- Pas d'effets significatifs du plomb sur les autres mesures neurocomportementales (TMT ; temps de réaction ralenti) ou sur le comportement relevé par les parents et enseignants.
- Même si elle est significative en terme statistique, la force de la corrélation avec la plombémie est faible et n'excède jamais 0.8% de la variance totale.

Cette corrélation négative, même minime, entre QI et exposition au plomb ressort également dans de nombreuses autres études (Finkelstein et al., 1998), **ainsi que le fait que la toxicité du plomb affecte les enfants si faible que soit l'exposition.** Ces effets du plomb semblent légèrement plus importants pour les catégories socioprofessionnelles les plus basses mais les chercheurs divergent quant à l'interprétation de ce fait. Pour certains, le plomb est simplement un marqueur d'un désavantage social, tandis que d'autres suggèrent que l'effet du plomb puisse être atténué par un environnement enrichi. Plus récemment, des études prospectives ont tenté de clarifier la contribution de cette exposition chronique par l'environnement au plomb à l'altération des fonctions comportementales et cognitives de l'enfant.

B – Etudes prospectives

Il s'agit d'une approche longitudinale des effets d'une exposition au plomb durant les périodes les plus vulnérables du développement, et qui permet d'obtenir plusieurs données pour un même sujet. L'exposition précoce au plomb est quantifiée par l'analyse de la concentration en plomb dans le sang maternel pendant la grossesse et /ou dans le cordon ombilical au moment de la naissance.

Six études majeures ont été réalisées, à Boston, Cleveland et Cincinnati aux Etats-Unis, Sydney et Port Pirie en Australie et au Kosovo. Ces études sont relativement compatibles dans leur conception, avec des échantillons de taille adéquate, des méthodes semblables pour mesurer l'exposition au plomb et les conséquences sur le développement, ainsi que les covariables et les éléments perturbateurs (comme le QI de la mère ou le barème HOME qui évalue la qualité de l'environnement domestique). Parmi les tests retenus, le Bayley Scales of Infant Development est utilisé chez l'enfant de moins de 2 ans. Il comprend un index de développement mental (MDI) qui évalue le comportement linguistique, les relations spatio-visuelles, la coordination sensori-motrice et la mémoire, et un index de développement psychomoteur (PDI) des capacités motrices fines et grossières. Le McCarthy Scales, dont l'index général cognitif (GCI) évalue les mêmes fonctions que le MDI ou les Kaufman Assessment Battery for Children (K-ABC) sont utilisés jusqu'à 3 ans, puis le WPPSI ou le WISC- révisé jusqu'à 5 à 6 ans. Le tableau III résume ces études.

Tableau III : Etudes longitudinales sur les effets neurocomportementaux d'une exposition chronique environnementale au plomb.

Auteurs et année de publication	Localisation	Age des sujets	Nombre de sujets initiaux	Exposition au plomb (Pb=plombémie)	Tests utilisés	Points clés
Bellinger et al., 1984, 1986, 1987, 1989, 1990, 1991	Boston, MA	Naissance-10 ans	249	Pb-cordon (faible 1-8 µg/dl, élevée 14.6µg/dl) Pb-6, 12, 24 mois (faible < 10 µg/dl, élevée > 10 µg/dl)	Echelles de Bayley (MDI, PDI) McCarthy GCI WISC-R	1) Corrélation négative Pb-cordon/ Bayley MDI jusqu'à 24 mois. 2) Pas de corrélation plombémie/ Bayley MDI à 6 mois. 3) Corrélation négative plombémie à 24 mois/ performances sur l'échelle de McCarthy ; effet prénatal du plomb encore présent à 57 mois pour enfants de faible SES. 4) Corrélation négative WISC-R/ plombémie 24 mois.
Dietrich et al., 1987, 1990, 1991, 1992, 1993	Cincinnati, OH	Naissance-6.5 ans	305	Pb-cordon (moy.= 8 µg/dl), Pb de 24 à 60 mois	Echelles de Bayley K-ABC WISC-R	1) Corrélation négative Pb-cordon/ Bayley MDI à 6 mois (Φ à 24 mois) ; K-ABC à 5 ans (Φ à 4 ans). 2) Corrélation négative Pb-postnatale / WISC-R à 6.5 ans.
Emhart et al., 1986, 1987, 1988, 1989	Cleveland, OH	Naissance-4 ans	162	Pb-cordon (moy.= 5.8 µg/dl), Pb de 6 mois à 4 ans	Echelles de Bayley WPPSI	Corrélation négative Pb-cordon/ scores de Bayley à 6 mois ; pas à 1, 2, 3 ans ni pour WPPSI après ajustement des covariables.
Wigg et al., 1988; McMichael et al., 1988; Baghurst et al., 1992; Vimpani et al., 1989	Port-Pirie, Australie	Naissance-7 ans	537	Pb-cordon (moy.= 8.8 µg/dl), Pb sur 7 ans, Pb-dents à 7 ans	Echelles de Bayley McCarthy GCI WISC-R	1) Corrélation négative Pb-6 mois/ Bayley MDI à 2 ans (mais pas avec Pb-cordon). 2) Corrélation négative Pb_2 et 3 ans/ McCarthy GCI à 4 ans. Corrélation encore plus forte avec l'index de Pb-postnatale cumulative. 3) Corrélation négative Pb dans sang et dents à 7 ans/ WISC-R.
Wasserman et al., 1992, 1994, 1995	Kosovo, ex-Yougoslavie (ville minière et autre)	Naissance-4 ans	392	Pb (moy.= 35.5 µg/dl (ville minière), Pb (moy.=8.4µg/dl autre ville)	Bayley MDI McCarthy GCI	1) Effets du plomb parfois confondus avec effets de l'anémie. 2) Corrélation négative Pb/ GCI à 4 ans et problèmes de comportement.
Cooney et al., 1982, 1986, 1989	Sydney, Australie	Naissance-5 ans	318	Pb-cordon (moy.= 8.1µg/dl)	Bayley MDI	Pas de corrélation significative Pb/ MDI.

Source : Banks et al./ Neurotoxicology 18 (1997) p. 244.

En dépit des efforts d'harmonisation consentis, les résultats ne sont que partiellement cohérents entre les études (Winneke et al., 1995). Seulement quatre d'entre elles rapportent une corrélation négative entre les indices d'exposition pré ou périnatale au plomb et les scores de MDI et /ou PDI du test de Bayley de 6 à 12 mois, à 2 ou à 4 ans, mais ces corrélations ne sont pour la plupart plus détectables

L'effet sur le comportement des enfants de l'exposition à de faibles taux de plomb est un aspect potentiel supplémentaire des déficits induits par le plomb. Reprenant les conclusions des études menées à ce sujet, Wigg (2001) rappelle que Mendelshon et al. ont montré une différence significative dans le comportement d'enfants âgés de 12 à 36 mois en comparant des groupes dont la plombémie était inférieure ou supérieure à 10 µg/dl. Le comportement fut mesuré par l'échelle d'évaluation de Bailey .

Pendant de nombreuses années, il fut suggéré que l'exposition au plomb aille de pair avec un déficit d'attention par hyperactivité, un comportement agressif et une tendance à la délinquance. La plupart des recherches avançant ces associations étaient peu convaincantes, étant des études sur un cas particulier, ou bien de petites études à éléments croisés ou encore des études dans lesquelles peu d'attention était portée aux cofacteurs.

Plus récemment, Wasserman et al (1998*) menèrent une étude prospective dans deux villes du Kosovo. Ils utilisèrent le Child Behaviour Checklist (CBC) pour mesurer les problèmes de comportement d'enfants de trois ans, en tenant compte des facteurs socio-démographiques et de l'existence de tempéraments difficiles. Ils trouvèrent une association significative entre les scores sur l'échelle de destruction du CBC et les plombémies. Pour eux, les facteurs socio-démographiques expliquent 7 à 18 % de la variance dans les sous-catégories du CBC, les tempéraments difficiles 2 à 5 % et l'exposition au plomb 1 à 4 %.

Ainsi, toutes ces recherches tendent à confirmer qu'une exposition à de faibles teneurs en plomb (10 à 20 µg/dl, voire moins) d'enfants en développement ait réellement des effets, mêmes modestes, sur le développement mental, les capacités motrices fines et le comportement. Reste à savoir si ces effets néfastes du plomb sont permanents.

C – Persistance et dynamique des effets du plomb

L'exposition à de fortes teneurs en plomb pouvant causer une atteinte permanente du développement intellectuel des enfants, il est logique de se demander si les effets d'une exposition à de faibles teneurs en plomb sont transitoires, durables ou même permanents. C'est dans cet optique que Tong (1998) analyse les résultats de quatre études sur ce sujet.

Needleman et al. (1990) ré-examinèrent 132 sujets d'une étude menée dans deux zones suburbaines de Boston et trouvèrent que les déficits neuropsychologiques associés aux taux de plomb dans les dents pendant la petite enfance persistaient 11 ans plus tard. Les sujets dont les taux de plomb dépassaient 20 ppm appartenaient davantage au groupe de sujets amenés à abandonner le lycée que ceux ayant moins de 10 ppm de plomb. De plus, ils étaient plus souvent retrouvés parmi les enfants qui témoignaient d'un absentéisme et d'un temps de réaction accrus, d'un vocabulaire, d'un raisonnement grammatical et d'une coordination main-œil diminués. Cependant il faut noter que des cofacteurs potentiels comme la qualité de l'environnement familial et les risques médicaux n'ont pas été pris en compte.

148 enfants issus des classes moyennes et supérieures de Boston ont été suivis jusqu'à l'âge de 10 ans par Bellinger et al.(1992). Leur développement cognitif fut mesuré à 10 ans à l'aide du WISC-R et du test d'achèvement de l'éducation de Kaufman (K-TEA). Ils constatèrent que des plombémies faiblement élevées (6.5 µg/dl) vers l'âge de deux ans étaient associées à des déficits des performances intellectuelles à 10 ans. Par contre, cette association n'a pas été retrouvée quand les enfants ont grandi.

Une troisième étude fut menée en Nouvelle-Zélande, à Christchurch, par Fergusson et al.(1993). Ils étudièrent les relations entre le taux de plomb dans les dents et le développement de la capacité à reconnaître les mots entre 8 et 12 ans dans un échantillon de 636 enfants. Les scores aux tests de lecture furent inférieurs de 5 points chez les enfants ayant 8 ppm de plomb par rapport à ceux ayant moins de 3 ppm. Après contrôle des cofacteurs potentiels, la différence entre les enfants ayant le plus important et le plus faible taux de plomb fut réduite à 3 points. Ceci correspond à un retard scolaire de 4 à 6 mois pour les enfants ayant un taux intermédiaire de plomb. Récemment, des chercheurs examinèrent les associations entre le taux de plomb dans les dents vers 6-8 ans et la réussite scolaire à 18 ans. Les enfants ayant eu précocement des taux de plomb élevés lisaient moins bien, quittaient l'école plus tôt et plus souvent sans qualification, et avaient moins de succès dans leurs examens.

Une étude prospective suivit 375 enfants de Port-Pirie de la naissance jusqu'à 11-13 ans (1996). Elle montra que des différences entre les plombémies moyennes des tertiles les plus bas et les plus élevés de 13.4, 12.7, 10.9 et 7.6 µg/dl à l'âge de 2, 4, 7 et 13 ans correspondaient à des différences dans les scores aux tests de développement de 4.0, 4.8, 4.9 et 4.5 points pour chacun de ces âges après le contrôle de nombreux cofacteurs. Ainsi, les enfants ayant précocement des plombémies plus importantes associées à des scores moins bons n'améliorent pas leur classement vers 13 ans, alors que les plombémies ont régulièrement diminué. Cette étude permit également de constater l'impact à long-terme du plomb sur le comportement des enfants comme le montrèrent les mesures par le CBC des problèmes émotionnels et comportementaux, qui augmentèrent de 2.1 et 3.5 points chez les garçons et de 0.8 et 1.8 points chez les filles quand la plombémie passait de 10 à 30 µg/dl.

L'évolution de l'influence d'une exposition précoce au plomb sur le développement des enfants peut suivre trois voies : une tendance à la dégradation des performances, un décrétement constant des scores cognitifs ou une récupération progressive des capacités altérées. Si la première étude de Boston est inclassable tandis que la deuxième est sujette à caution du fait de la perte d'un très grand nombre de sujets étudiés, les études de Christchurch et de Port-Pirie sont quant à elles toutes deux en faveur d'un modèle à décrétement constant. **Toutes ces études ont par ailleurs trouvé que les déficits cognitifs associés à une exposition précoce au plomb persistaient avec une magnitude quasiment inchangée à la mi-enfance, alors que l'exposition au plomb avait considérablement diminué, ce qui serait en faveur d'un déficit durable.** En outre, le fait que le développement cognitif de l'enfant n'évolue quasiment plus après la mi-enfance suggère que ces déficits dus à une exposition précoce au plomb soient irréversibles. Cependant, la réversibilité des effets du plomb est un phénomène complexe qui demande à être

corroboré par des preuves supplémentaires lors d'expérimentations animales ou d'études toxicologiques. De plus, il est important de noter que de nombreux facteurs peuvent influencer la portée des effets initiaux et à long-terme d'une exposition au plomb, qu'il s'agisse des modalités de réalisation des études ou de l'interférence de facteurs familiaux et sociaux.

2 – Problèmes méthodologiques rencontrés dans ces études

A – Mesure de l'exposition au plomb

Les chercheurs ont utilisé la teneur en plomb soit du sang soit des dents pour évaluer l'exposition au plomb des enfants, mais chacune a ses inconvénients. La plombémie est utilisée pour évaluer une exposition récente mais n'est qu'un piètre indicateur des expositions précédentes puisque le plomb est rapidement excrété ou stocké dans les os. La teneur en plomb des dents a l'avantage de refléter une exposition cumulative au plomb, cependant cela ne permet pas de déterminer l'âge ou le schéma d'exposition, qui peuvent être des facteurs critiques de la toxicité du plomb. Les chercheurs doivent alors se fonder sur les informations obtenues des parents. Des mesures multiples espacées dans le temps procurent des renseignements plus valables ; cette approche est d'ailleurs devenue la norme dans les études prospectives.

B – Echantillonnage

Les études sur les effets du plomb, comme c'est fréquemment le cas, se sont heurtées au problème du volontariat, et les différences entre les parents qui acceptèrent ou refusèrent de participer aux études introduisent une source potentielle de biais. En général, un statut socio-économique et une éducation parentale de haut niveau vont de paire avec la participation et l'assiduité dans les études longitudinales, et certaines des mesures réalisées sur ces enfants reflètent ce fait. Les taux d'abandon des enfants moins avantagés peuvent réduire la chance de trouver des résultats significatifs associés à l'exposition au plomb.

C – Mesure des effets cognitifs et comportementaux

Le résultat des mesures de développement cognitif varie selon les études, qui ont pour la plupart combiné des mesures globales d'intelligence, comme le WISC-R, avec différentes batteries de tests issus de la littérature neuropsychologique. Typiquement ces études ne détaillent pas clairement les adaptations qu'elles y ont apportées pour les appliquer à des enfants. Bellinger (1993) note qu'une attention plus grande est portée à la mesure du taux de plomb et aux analyses statistiques qu'à la mesure des conséquences de l'exposition. Jusqu'à maintenant, ces études ont échoué à faire émerger unanimement des déficits spécifiques de l'exposition au

plomb chez les enfants en âge d'être scolarisés, essentiellement parce qu'il n'existe pas encore de batterie de tests pour les enfants scolarisés, validée et acceptée, qui reflète les dommages et déficits dans les différentes régions du cerveau.

Dans les études prospectives, il y a plus de cohérence dans les résultats, mais pas d'amélioration dans la spécificité. Ce sont les échelles de Bayley et de McCarthy qui ont été les plus utilisées. Quand les scores des sous-barèmes de McCarthy sont reportés, ce sont les scores de Perceptual-Performance qui paraissent les plus liés au taux de plomb (études de Port-Pirie, de Boston et du Kosovo). Ce barème est cependant encore assez général, et les échelles de McCarthy n'ont pas été remises aux normes depuis 1972. Il devient donc important d'améliorer l'évaluation neuropsychologique des jeunes enfants.

De plus, si des expositions à de faibles taux de plomb n'affectent que certaines régions du cerveau, ces effets peuvent être masqués par un score cognitif global.

D – Mesures de l'attention et du comportement en classe et à domicile

Bien que les mesures cognitives aient été les principales variables étudiées dans la recherche sur l'exposition à de faibles teneurs en plomb, les études se sont également penchées depuis Byers et Lord (1943*) sur les relations avec d'autres mesures du comportement. Les recherches qui ont suivi ont été conduites pendant une période de redéfinition des concepts d'hyperactivité et d'attention. En effet, l'hyperactivité n'est plus conceptualisée comme une augmentation de la seule activité motrice, mais plutôt comme une tendance des enfants à écouter, suivre les règles, tirer des enseignements des conséquences de leur comportement et se conformer à des directives qui demandent de rester assis (Barkley, 1990*). Certaines études ont ainsi utilisé chez des enfants scolarisés des mesures cohérentes avec cette définition de l'inattention, comme les barèmes de Connors et de Rutter. Elles trouvent souvent une association entre l'exposition au plomb et la mesure d'interruption des tâches (Hansen, 1989* ; Bergomi, 1989*...), ou entre le plomb et l'exécution centrée (sélectionner puis répondre à une information critique), et entre le plomb et le changement (ne plus centrer son attention sur un stimulus mais sur un autre au moment approprié) (Bellinger et al., 1994). Cependant la question de la causalité peut être posée : les enfants sont-ils hyperactifs à cause du plomb ou sont-ils plus exposés au plomb de par leur hyperactivité ? De plus les critères d'évaluation reposant sur le jugement des enseignants et des parents peuvent introduire un biais du fait de la subjectivité de ceux-ci.

E – Le contrôle des cofacteurs

D'après Bellinger, « les facteurs contextuels affectent la forme par laquelle la toxicité du plomb est exprimée » ; il n'est donc pas surprenant que des études épidémiologiques effectuées dans des populations qualitativement différentes ramènent des résultats variés (McMichael, 1995). La plupart des études essaient de contrôler statistiquement les effets génétiques et environnementaux comme le statut socio-économique, l'intelligence ou l'éducation des parents, mais il existe

d'importantes divergences dans la sélection, la mesure, l'interprétation et le poids accordés à ces covariables. De plus, si les mesures des statuts socio-économiques et de l'éducation des parents sont raisonnablement comparables parmi les études, l'évaluation du QI parental s'avère problématique. Les chercheurs sélectionnent souvent un index rapide de QI pour ne pas soumettre les parents à un test trop long, ce qui n'est pas suffisant pour une évaluation précise. Ou alors, ils ne précisent pas les tests employés ou bien se servent de tests non adaptés à l'ethnie majoritaire. Il est alors difficile d'interpréter l'effet de ce paramètre sur la diminution des corrélations entre l'exposition au plomb et les scores cognitifs des enfants.

Plus récemment le HOME, interview structurée combinée avec l'observation du domicile, est apparu dans plusieurs études prospectives. Cette évaluation très développée de l'environnement des jeunes enfants, qui prend en compte la stimulation intellectuelle et la sensibilité des parents, a souvent fait disparaître les liens entre plomb et développement quand elle a été utilisée comme covariable, ce qui pose toutefois certains problèmes. En effet, beaucoup de critères du HOME peuvent être le reflet de la présence ou des effets du plomb plutôt que la mesure de sources de variations indépendantes du développement de l'enfant. On mesure par exemple la propreté alors que le plomb peut être contenu dans la poussière. Il y a aussi le problème des interactions entre les caractéristiques de l'enfant et la façon dont on va l'élever. Le HOME, par exemple, tient compte du nombre de fois où l'enfant sort, du nombre de jouets utilisés et de leur valeur éducative et de la discipline, ces paramètres étant observés pendant l'interview. Or un enfant curieux ou facile peut connaître des expériences différentes d'un autre dont les processus cognitifs ou le contrôle de soi sont affectés par le plomb. Les effets transgénérationnels doivent également être pris en compte : une mère exposée au plomb peut montrer des problèmes d'attention qui affecteront ses interactions avec ses enfants. Il faut donc être prudent quand on assimile les critères du HOME à autant de variables indépendantes (Banks et al., 1997), ce qui a pu conduire à une sous-estimation des effets du plomb.

Pour résumer les résultats de ces recherches épidémiologiques et comportementales, et des problèmes méthodologiques qu'elles soulèvent, on peut conclure que de faibles teneurs en plomb, comme celles actuellement présentes dans notre environnement, ont des effets négatifs sur le développement cognitif des enfants. Ces effets sont peu importants en terme de scores de tests mais peuvent avoir des conséquences sociales significatives, bien que la persistance dans le temps des effets du plomb soit encore en discussion. Les problèmes méthodologiques d'échantillonnage, les diverses méthodes de mesure du plomb, l'absence de mesure précise des déficits cognitifs, spécialement pendant la petite enfance, et le contrôle de cofacteurs pas toujours indépendants des effets du plomb ont tous pu contribuer à sous-estimer les effets d'une exposition précoce au plomb sur le développement des enfants.

On le voit, les études épidémiologiques ont montré leurs limites dans la recherche sur les liens précis entre plomb et neurodéveloppement. C'est pourquoi les modèles animaux se sont révélés d'une grande aide pour approfondir nos connaissances sur les effets du plomb et sur les mécanismes sous-tendant ces effets.

III – Conséquences d'une exposition chronique au plomb sur le développement cognitif et comportemental dans les modèles animaux

1 – Altération par le plomb de différents aspects des processus d'apprentissage

Il est certain que l'exposition au plomb d'animaux pendant le développement résulte en une altération des tests d'apprentissage et de mémoire à court-terme. La question qui se pose est quels sont les mécanismes comportementaux qui sous-tendent ces observations ?

De nombreuses stratégies sont nécessaires pour détecter les modifications subtiles produites par le plomb, ainsi que pour élucider les raisons de ces altérations. Voici un panorama des mécanismes mis à jour et des tests qui ont permis de les déceler.

A – Incidence de l'exposition au plomb sur l'apprentissage spatial

Un des tests les plus utilisés pour évaluer l'apprentissage spatial chez le rat exposé au plomb est le labyrinthe aquatique de Morris. Il s'agissait à l'origine de tester la capacité des rats à apprendre et à mémoriser la position d'une plate-forme cachée dans une piscine d'eau opaque par rapport à des repères extérieurs. D'importantes connaissances sur les bases neurochimiques, neuroanatomiques et neurophysiologiques des comportements associés à ce test ont été mises à jour, notamment le fait que les deux plus puissants antagonistes de l'apprentissage spatial agissent sur les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et cholinergiques muscariniques, qui sont également deux cibles du plomb chez le rat. En outre le plomb interfère avec l'induction de la potentiation à long-terme, dont on a montré qu'une altération pouvait conduire à une diminution des performances dans le labyrinthe de Morris.

C'est pourquoi ce test a été choisi par Jett et al. (1997) pour évaluer l'incidence d'une faible exposition continue au plomb (250 ppm) débutée 10 jours avant l'accouplement sur les performances des rats à un stade précoce (jour post naissance 21 ou PN21) ou plus tardif (PN56 et PN96). Cette étude a d'abord révélé que les plus fortes plombémies sont relevées à PN21 pour ensuite décroître. Dans le labyrinthe de Morris, les rats exposés dont on teste la mémoire à long-terme sont significativement plus longs à trouver la plate-forme cachée. Cet effet n'est constaté qu'à PN21. Aucun effet n'est noté concernant la mémoire à court-terme. Cependant lors d'une autre expérience (1997), ces mêmes auteurs, en diminuant le nombre d'essais quotidiens et en espaçant davantage les essais, **ont mis en évidence un net effet sur l'apprentissage spatial d'une exposition maternelle (pendant la gestation et la lactation) ou permanente au plomb sur des rats âgés de 90 jours.**

De la même façon, une exposition subchronique transitoire (5, 10 ou 25 mg/kg donnés à PN6, 9, 12, 15 et 18) pendant la lactation se traduisant par la suite par une très faible plombémie ($<10 \mu\text{g/dl}$) diminue les performances spatiales des jeunes rats (âgés de 38 à 42 jours) (Stewart et al., 1998).

B – Mise en évidence d'un déficit d'attention et/ou d'un comportement d'obstination

Chez l'enfant, une des hypothèses pour expliquer les déficits cognitifs rencontrés après une exposition au plomb est l'apparition d'un défaut d'attention. Certaines études expérimentales l'ont elles aussi suggérées (Winneke et al., 1977* ; Zenick et al, 1978* ; Laughlin et al, 1983*). Plus récemment, des chercheurs se sont à leur tour penchés sur cette hypothèse, chez le rat et chez le singe.

Cohn et al. (1993) ont pour cela utilisé un schéma multiple d'acquisition répétée (RA) et de performance (P) sur des rats exposés au plomb depuis le sevrage (à 0, 50 et 250 ppm donnant une plombémie de 2.8, 25.1 et 73.5 $\mu\text{g/dl}$). Dans ce test, des séquences de trois réponses sont renforcées ; la séquence correcte pendant la phase RA change à chaque session expérimentale tandis qu'elle reste toujours la même (Gauche, Centre, Droit - GCD) pendant la phase P. Après un entraînement progressif, les rats sont soumis à 60 sessions de une heure. Au cours de chacune d'entre elles, chaque composante (RA et P) est présentée deux fois, la première présentation étant référencée P1 et RA1 et la deuxième P2 et RA2. Ils constatent que l'exposition au plomb à de telles concentrations est associée à un déficit sélectif d'apprentissage : en effet, seul les taux de réussite de RA2, et non de P2, sont affectés.

Par ailleurs, les analyses des mesures parmi les rats exposés révèlent deux faits remarquables :

- Pendant la phase RA2, on relève un niveau plus élevé de séquences DGC et CDG impliquant la même transition de la gauche vers la droite que pendant la phase P (GCD), ainsi qu'une proportion plus importante de couples de réponses impliquant ce sens de transition. Ces données suggèrent que l'une des voies par laquelle le plomb altère l'acquisition de nouvelles séquences pendant la phase RA est le renforcement d'un comportement incompatible, c'est à dire ici l'émission de séquences GCD. Les rats exposés au plomb persévèrent dans ces séquences P-like pendant les deux phases du schéma multiple, un comportement incompatible avec l'apprentissage de nouvelles séquences.

- Un autre type de comportement de persévérance est noté : pendant la phase RA2, les rats exposés au plomb montrent une proportion accrue de réponses successives sur le même levier, ce qui ne relève alors plus du renforcement d'un schéma de comportement préexistant.

Cette mise en situation, qui peut paraître artificielle, peut en fait être comparée à ce qui se passe dans une classe où alternent des périodes de récitation avec des moments nécessitant un nouvel apprentissage.

Les déficits d'apprentissage attribués à l'exposition au plomb chez les enfants et les animaux d'expérimentation ont souvent été décrits comme le résultat de déficits d'attention analogues à l'hyperactivité, caractérisée par l'impulsivité, la distractibilité et l'incapacité à se fixer sur une tâche. Ces descriptifs s'accordent mal avec **le comportement noté chez les rats exposés au plomb dans les conditions décrites ci-dessus, qui se traduit par l'absence de changement d'activité et la persévérance dans une seule tâche.** Ainsi alors que des déficits d'attention typiques de l'hyperactivité sont associés au plomb dans certaines circonstances, un scénario de persévérance, comme celui noté ici, peut prédominer dans d'autres conditions expérimentales.

Ces résultats sont corroborés par ceux de l'équipe de Rice (1993), qui a centré ses recherches sur les primates à travers plusieurs tests spécifiques.

Le test de discrimination réversible consiste à faire choisir à un singe parmi au moins deux objets de formes, positions et/ou couleurs différentes un objet d'une couleur précise, puis une fois cette tâche acquise, à lui faire choisir celui de l'autre couleur. La modification peut aussi porter sur la forme ou la position de l'objet. Différentes expériences, récapitulées dans le tableau IV, ont montré que l'exposition au plomb, si elle n'altère pas la capacité des singes à choisir un objet précis parmi d'autres, ralentit cependant leur réussite à accomplir des choix réversibles successifs. L'introduction de caractéristiques supplémentaires n'entrant pas en ligne de compte lors du choix (par exemple, choisir une forme carrée parmi des formes carrées et en croix, rouges ou vertes) permet d'étudier la distractibilité, qui paraît augmentée chez les singes exposés. Ces études mettent donc en relief une adaptabilité moindre et une distractibilité accrue chez les singes exposés précocement au plomb.

La deuxième partie du tableau IV montre également que lors d'une tâche discriminative spatiale (choix d'un bouton selon sa position), une altération est notée même lorsque l'exposition n'a lieu que pendant l'enfance, contrairement aux premières expériences (tâches non spatiales). Les tâches spatiales et non spatiales peuvent donc être affectées différemment selon la période du développement pendant laquelle a lieu l'exposition.

Tableau IV : Effets du plomb sur la discrimination réversible spatiale et non-spatiale chez les singes.

			Présence d'éléments perturbateurs			
	Tâche 1		Tâche 2		Tâche 3	
	Aquisition	Reversion	Aquisition	Reversion	Aquisition	Reversion
Non spatial - <u>Pb depuis naissance</u> plombémie 11 µg/dL plombémie 13 µg/dL - <u>Plombémie 20 µg/dL</u> depuis naissance début après enfance durant enfance seule		♦ ♦ ♦ ♦	♦ ♦ ♦ ♦	♦ ♦ ♦ ♦		♦ ♦
Spatial - <u>Pb depuis naissance</u> plombémie 11 µg/dL plombémie 13 µg/dL - <u>Plombémie 20 µg/dL</u> depuis naissance début après enfance durant enfance seule		♦ ♦ ♦	♦ ♦ ♦ ♦	♦ ♦ ♦ ♦	♦ ♦ ♦ ♦	♦ ♦ ♦ ♦

♦ indique la présence d'un déficit par rapport aux singes témoins.

Ces tests ont lieu sur des singes adultes âgés de 9 à 10 ans. La présence d'éléments perturbateurs correspond à l'introduction, parmi les signaux devant être mémorisés, de signaux de forme ou de couleur différentes dont les singes ne doivent pas tenir compte.

Source : DC Rice / *Neurotoxicology* 14 (1993) 167-178.

Une autre tâche spatiale touchée par le plomb consiste à choisir une réponse parmi deux puis à choisir l'autre la fois d'après, etc..., en respectant une pause d'une durée déterminée entre deux réponses. Les singes traités (plombémie de 11 et 13 µg/dl) ont plus de difficultés à acquérir le mécanisme de base, ils appuient indifféremment sur les deux boutons, ce qui constitue un échec à l'inhibition d'un comportement inapproprié. Une fois ce mécanisme acquis, certains d'entre eux, bien qu'ils aient la même réussite que les singes non traités lorsque la pause est courte, voient leur succès diminuer avec l'allongement de la pause. Ils font alors plus de réponses identiques. Les résultats sont identiques quelle que soit la période d'exposition.

Les résultats de ce test sont confirmés par ceux obtenus lors d'appariement, après un certain délai, d'échantillons, qu'ils soient spatiaux ou non. De plus, là encore des stimuli supplémentaires augmentent davantage la distractibilité chez les singes traités au plomb.

Ce comportement de persévérance est également relevé par Brockel et Cory-Slechta (1998) chez des rats exposés à partir du sevrage, dans un test où après une récompense pour 50 pressions sur un levier, les rats doivent attendre de plus en plus longtemps sans répondre pour obtenir « gratuitement » d'autres récompenses. Le plomb augmente le nombre de réponses pendant ce temps de pause et diminue le temps maximal d'attente. Les auteurs suggèrent que l'exposition au plomb diminue la capacité à attendre ou bien amoindrit la capacité à inhiber un comportement inapproprié, ou bien encore favorise un comportement répétitif.

Toutes ces observations tendent à accréditer l'idée d'une capacité du plomb à faire apparaître des comportements de persévérance, de distractibilité accrue et d'incapacité à inhiber une réponse inappropriée, ces deux derniers étant symptomatiques d'un déficit d'attention. Il n'est pour autant pas acquis que les déficits d'apprentissage et de mémoire relèvent uniquement de ces mécanismes.

C – Altération par le plomb des capacités associatives

L'hypothèse précédemment évoquée selon laquelle le plomb est à l'origine d'une tendance à persévérer est en partie contredite par Garavan et al. (2000), qui attribuent ces résultats à un déficit spécifique des capacités associatives, c'est à dire à une incapacité à faire le rapprochement entre une réponse fausse et l'absence de récompense.

Ils appuient leur théorie sur l'étude de rats exposés pendant la lactation à 300 ou 600 ppm d'acétate de plomb (L300 et L600) ou à 300 ppm d'acétate de plomb pendant la gestation et la lactation (GL300). Des tests olfactifs à double choix, réversibles 6 fois, ont lieu à partir de PN110.

Le taux d'apprentissage global là encore n'est pas affecté par le plomb, les différences n'apparaissant que lorsque l'on passe à l'étude de chacune des phases d'apprentissage. Il s'agit de la phase de persévérance, qui s'étend du début de l'interversion de la bonne réponse jusqu'au moment où le taux de paires de fausses réponses est inférieur à 50%. Commence alors la phase de post-persévérance qui s'achève au moment où le taux de bonnes réponses atteint 88%. Les résultats montrent alors que l'exposition au plomb n'affecte pas la durée de la phase de persévérance mais augmente le nombre d'essais pour maîtriser la tâche dans la phase de post-persévérance. Les facteurs responsables de cet allongement de la deuxième phase sont deux effets indépendants :

- La préférence spatiale pour une réponse (par exemple, les rats préfèrent le tunnel de gauche à celui de droite).
- Une capacité moindre à associer signaux et/ou actions à une conséquence affective, ce qui a également été souligné lors d'un test de vigilance où les animaux exposés réagissent moins à un échec lors du test précédent.

Ce déficit associatif consécutif à une exposition chronique au plomb au cours du développement a également été mis en évidence par ces mêmes chercheurs lors d'un test de discrimination visuelle (Morgan et al., 2000). La conclusion de ce test est

que cet allongement de la phase de post-persévérance n'est pas seulement la conséquence (bien qu'elle puisse l'être en partie) d'un déficit d'attention. Autre constat intéressant de cette étude, le fait que l'augmentation du taux d'exposition au plomb se traduit davantage par un nombre accru d'individus déficients que par une augmentation générale du taux d'échec : cela suggère l'existence de différences individuelles dans la susceptibilité à la neurotoxicité du plomb, constat déjà fait par Rice (1993) sur les singes.

Ces chercheurs proposent donc d'autres explications à l'échec induit par le plomb à la réversibilité d'un apprentissage que le comportement de persévérance. Cependant, ils ne sont pas en contradiction totale avec les précédentes études puisque l'incapacité à faire le lien entre une action et ses conséquences n'est pas tellement éloignée de l'incapacité à inhiber un comportement inapproprié.

Par ailleurs, si ces résultats sur la réversibilité de l'apprentissage montrent quelques différences selon les études, cela peut être dû aux interactions du plomb avec d'autres facteurs, comme le révèlent par exemple Schneider et al. (2001) qui montrent que le plomb affecte d'autant moins la réversibilité de l'apprentissage que l'environnement dans lequel sont élevés les animaux est riche, cet effet étant corrélé au taux de facteurs neurotrophiques.

2 – Persistance du déficit et périodes vulnérables

A – Persistance du déficit

Un petit nombre d'études ont détecté des corrélations entre une exposition au plomb durant l'enfance et les performances aux tests cognitifs plusieurs années plus tard. Cela suggérerait que même une exposition de courte durée au plomb, particulièrement durant le développement précoce, puisse aboutir à des dysfonctionnements cognitifs permanents, ce qui en ferait un problème de santé publique majeur. Ces conclusions demandent donc à être étayées par celles des modèles expérimentaux soumis à moins de covariables que sont les expérimentations animales.

La plupart de ces études ont observé des altérations cognitives et/ou comportementales chez les animaux testés pendant la période d'exposition. Cependant, les études ayant évalué la persistance des effets du plomb ont mis en évidence des résultats moins cohérents. Dressant un bilan des recherches menées à ce sujet, Garavan et al. (2000) constatent que **si certaines tâches ont révélé des effets cognitifs qui perduraient bien après la période d'exposition, cela n'est pas le cas pour beaucoup d'autres.**

Les facteurs à l'origine d'une telle disparité ne sont pas clairement élucidés. La présence ou l'absence d'un pic précoce de la concentration de plomb dans les tissus peut être un facteur important. Par exemple, des singes soumis à une exposition modérée durant leur première année, additionnée d'un fort pic d'exposition vers 5 à 6 semaines, montrent un taux d'échec significativement lié à la plombémie sur un test d'alternance spatiale à retardement, ce qui n'est pas le cas

des singes pour lesquels l'exposition au plomb est restée constante (Lewin et Bowman, 1988*). De la même façon, Garavan et al. (2000) ont constaté que des rats exposés pendant la gestation et la lactation ou seulement pendant la lactation montrent un pic de la plombémie à PN24, qui n'est pas comme ils l'ont vérifié dû à l'ingestion simultanée de plomb via le lait et l'eau de boisson mais à une absorption plus importante liée à la maturation de l'intestin à cette période. Bien que ces fortes plombémies soient de courte durée, probablement moins d'une semaine, ce pic pourrait avoir un rôle central dans la persistance des effets du plomb. Une étude dans laquelle ce pic est évité par une diminution de l'exposition entre PN20 et PN40 est effectivement caractérisée par l'absence des effets précédemment mis en évidence. Cette forte augmentation de la plombémie vers PN21 a d'ailleurs été rapportée par d'autres chercheurs (Kulhmann et al., 1997). Malheureusement, le manque de données sur l'évolution exacte de la plombémie durant ces périodes critiques ne permet pas de déterminer l'influence réelle de ce facteur sur les résultats.

Une autre explication à ces résultats contradictoires est la diversité des espèces étudiées, bien que ces contradictions aient aussi été rapportées au sein de la même espèce.

Un troisième facteur qui pourrait avoir compromis la détection des effets à long-terme du plomb est la nature de la tâche évaluée. A priori, il semblerait que l'exposition au plomb soit plus encline à affecter certaines fonctions cognitives que d'autres, du fait de la sensibilité différente des systèmes nerveux spécifiques. Cependant, cette explication n'est pas totalement satisfaisante, la plupart des tâches qui ont révélé une action durable du plomb ayant également donné des résultats négatifs dans d'autres études. Apparemment des différences mineures dans la façon dont une tâche est évaluée selon les études pourraient altérer les processus cognitifs mis en œuvre par cette tâche, ou altérer la sensibilité de cette tâche aux subtiles dysfonctionnements provoqués par le plomb dans les processus d'apprentissage. Si l'exposition au plomb n'affecte que certains processus cognitifs spécifiques, des différences mineures dans le protocole d'étude de la tâche peuvent l'avoir rendue insensible aux effets du plomb. Malheureusement, comme beaucoup d'études n'ont rapporté que les mesures globales des performances, il n'y a que peu d'information sur les processus cognitifs spécifiquement affectés par l'exposition au plomb dans tous ces travaux. C'est pourquoi il est pour l'heure difficile de déterminer si ces contradictions sont le fait d'échec de reproduction des études ou si elles reflètent la forte spécificité des effets neurotoxiques du plomb.

En résumé, il semble cependant probable qu'une courte période d'exposition précoce au plomb soit à l'origine d'effets cognitifs durables, si ce n'est irréversibles.

Cette apparente sensibilité du cerveau en développement à la neurotoxicité du plomb suggère l'existence d'une « fenêtre de vulnérabilité » à une exposition, même de faible intensité, au plomb.

B – Existe-t-il des périodes de plus forte vulnérabilité au plomb ?

Là encore, les études systématiques sur les effets neurotoxiques comparés du plomb au cours des différentes étapes du développement sont peu nombreuses et souvent contradictoires.

Parmi les études les plus récentes, et donc pour des taux de plomb se rapprochant davantage de ceux rencontrés dans l'environnement, Kulhmann et al.(1997) et Garavan et al (2000) se sont penchés sur cette question.

L'équipe de Kulhmann a évalué l'importance de l'atteinte des performances dans le labyrinthe de Morris à PN110 de rats exposés pendant la gestation et la lactation à 750 ppm d'acétate de plomb (GW 750), ou en continu depuis la gestation (GL 750) ou à partir du sevrage (WL 750 et WL 1000). Les résultats des mesures révèlent que l'exposition permanente (GL 750) ou maternelle (GW 750) altère significativement la réussite aux tests par rapport au groupe contrôle. L'exposition maternelle provoque également plus d'échecs que l'exposition après sevrage (WL 750 et 1000) alors que les plombémies mesurées au moment du test sont considérablement différentes, les plombémies des rats ayant été exposés pendant la gestation et la lactation étant quasiment retournées au niveau de celles des rats témoins au moment du test. Si cette dernière constatation est loin de faire l'unanimité, il est vrai que les effets durables sur une performance spatiale d'une exposition seulement maternelle ou bien permanente sont fréquemment relevés (Munoz et al., 1988* ; Wu, 1996*). Garavan et al. (2000) relèvent une altération du comportement associatif chez des adultes exposés pendant la gestation et la lactation (GW 300) ou seulement pendant la lactation (PN0-W 300 et 600), alors que pour d'autres tâches comme lors de test de la vigilance, le temps de réaction n'est augmenté que pour le groupe GW 300, pas pour les groupes PN0-W 300 et 600.

Ces relations complexes entre le moment du développement, l'intensité de l'exposition au plomb et le profil cognitif qui en résulte mettent en lumière la difficulté à formuler des conclusions générales à propos des effets de l'exposition au plomb sur la fonction cérébrale.

Pour résumer les conclusions les plus communément admises à propos des effets d'une exposition précoce au plomb sur le développement des fonctions cognitives et comportementales dans les modèles animaux, on peut conclure que **la variabilité des résultats des études à ce sujet tient également à ce que, à des expositions si faibles, les effets du plomb sur les mécanismes cérébraux sont subtils et n'affectent donc que certaines tâches très spécifiques. Parmi les effets couramment rapportés, l'exposition au plomb semblerait donc perturber l'apprentissage spatial, comme en témoignent entre autres les moindres performances dans le labyrinthe aquatique de Morris, et favoriserait la distractibilité et un comportement de persévérance, qui pour certains chercheurs est plutôt assimilable à un déficit des capacités associatives.**

Tous ces effets, s'il ne sont pas irréversibles, semblent toutefois durables pour certains d'entre eux. Et de nombreux indices amènent à penser qu'une exposition pendant les périodes de gestation et de lactation, périodes critiques du développement cérébral, serait plus à même de perturber ce développement.

Deuxième partie

**LES MECANISMES
MOLECULAIRES A LA BASE DE LA
MEMOIRE : DES CIBLES
POTENTIELLES POUR LE PLOMB.**

I – Vers une définition moléculaire du stockage de la mémoire

Les récentes études comportementales et biologiques ont montré que l'apprentissage et la mémoire ne relèvent pas d'un même procédé, mais d'une famille de procédés distincts, possédant chacun leurs propres règles. Au sens large, l'apprentissage peut être considéré comme un processus par lequel une information nouvelle sur l'environnement est acquise, et la mémoire comme un processus par lequel un savoir est retenu.

Des études récentes ont démontré que la mémoire peut être divisée en au moins deux grandes catégories. La mémoire explicite ou déclarative est le rappel conscient d'une connaissance à propos de personnes, d'endroits ou de choses, et est tout particulièrement développée dans le cerveau des vertébrés. La mémoire implicite ou non-déclarative est le rappel inconscient de gestes moteurs et autres tâches et inclut des formes associatives simples, comme le conditionnement classique, et des formes non-associatives, comme la sensibilisation et l'habituation.

Ces deux types de mémoire semblent impliquer différents circuits nerveux dans le cerveau. La mémoire explicite dépend uniquement du lobe temporal et des structures diencephaliques, par exemple l'hippocampe, le subiculum et le cortex entorhinal, alors que la mémoire implicite implique plutôt les mêmes voies sensibles, motrices ou associationnelles que celles utilisées dans l'expression du processus d'apprentissage.

Jusqu'à quel degré ces deux différentes formes de mémoire partagent-elles les mêmes composants moléculaires ? Un des arguments pour des mécanismes partagés vient de l'étude des différentes étapes du stockage de la mémoire, réalisée en partie à partir de l'ouvrage « Memory ,from mind to molecules» par Squire et Kandel, 2000.

La mémoire dans les formes implicite et explicite d'apprentissage est graduée et la durée de cette mémorisation est liée au nombre d'entraînements et est communément divisée en deux composantes temporellement distinctes : la mémoire à court-terme, allant de quelques minutes à quelques heures, et la mémoire à long-terme, qui dure des jours, des semaines, voire dans quelques cas la vie entière (*Bailey et al, 1996*).

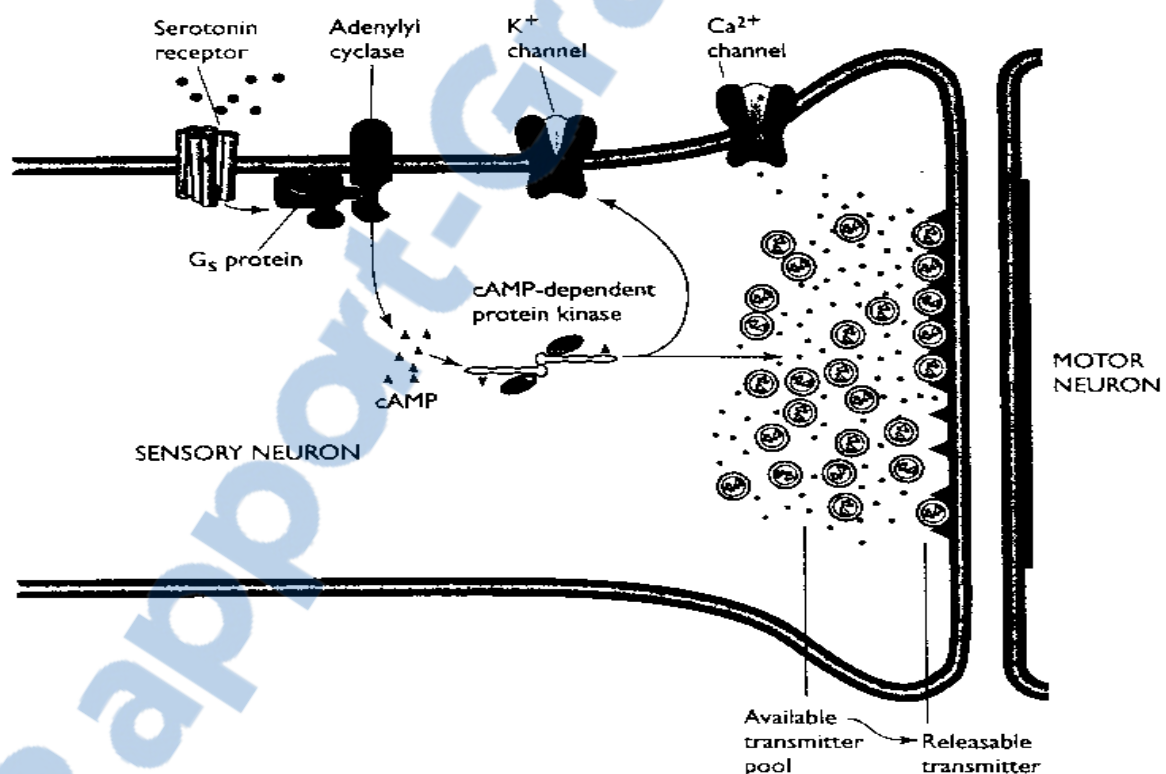
Il paraît important de développer ainsi les mécanismes moléculaires à l'origine de l'apprentissage et de la mémoire car on l'a vu, ce sont ces deux processus qui sont les plus particulièrement touchés chez les enfants suite à une exposition chronique à des quantités environnementales de plomb pendant le développement. Une des explications à cette observation réside donc dans l'effet d'une telle exposition au plomb sur les processus à la base de la mémoire, que l'on tentera d'analyser ensuite au niveau moléculaire.

1 – Mémoire implicite : le stockage de la mémoire réside dans la plasticité des synapses

Dans l'habituation, étudiée chez l'escargot marin *Aplysia*, on constate un affaiblissement des connections synaptiques pré-existantes au sein même du circuit à l'origine du comportement, dû à une plasticité des synapses non seulement dans le taux des neurotransmetteurs libérés mais aussi dans leur forme et leur structure. Ces résultats furent les premières preuves qu'un changement dans l'importance de l'activité synaptique peut contribuer au stockage de la mémoire.

C'est ensuite l'étude de la sensibilisation qui permet de dégager les premiers indices des mécanismes moléculaires sous-tendant le processus de mémoire, rapportés dans la figure 1.

Figure 1 : Etapes biochimiques lors de la facilitation présynaptique dans un neurone sensitif d'*Aplysia*.



Légende : La sérotonine se lie à un récepteur métabotrope, induisant le couplage d'une protéine G_s, ce qui conduit à l'activation de l'adényl cyclase, l'augmentation du taux d'AMPc, et pour finir à l'activation de PKA. PKA agit sur au moins deux sites. Elle ferme d'abord les canaux K⁺, d'où l'amplification du potentiel d'action qui accroît à son tour la libération de transmetteurs, et l'augmentation consécutive de l'afflux de Ca²⁺ via les canaux calcium. En second lieu, PKA agit directement sur certaines étapes encore inconnues du processus de libération des neurotransmetteurs.

Source : LR Squire et ER Kandel, *Memory, from mind to molecules*. 2000.

Le conditionnement classique, découvert par Pavlov, permet d'associer deux stimuli, provoquant une réponse plus importante et plus durable que la sensibilisation : un stimulus inapproprié (dit conditionné) peut produire une réponse s'il a été souvent associé à un fort stimulus (dit non-conditionné) qui le suit de peu. Ce phénomène d'association était, pensait-on, supporté par des circuits complexes, jusqu'à ce que Donald O. Hebb, en 1949, suggère que ce mécanisme ne soit dû qu'à l'interaction de simples cellules : « Quand un axone d'une cellule A est suffisamment proche d'une cellule B pour l'exciter et le fait de façon répétée ou persistante, des processus de croissance ou des changements métaboliques apparaissent dans une ou dans les deux cellules de telle manière que l'efficacité de A pour exciter B est accrue. » (Rison et Stanton, 1995).

La base moléculaire de cette propriété repose en grande partie sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ce récepteur ionotrope est un des trois types de récepteurs au glutamate (avec le récepteur AMPA et les récepteurs métabotropiques) impliqués dans la transmission synaptique excitatrice au niveau du cerveau. Lors d'une transmission synaptique normale, comme lors de l'habituation ou de la sensibilisation, seul le récepteur AMPA est activé par le glutamate car le canal du récepteur NMDA est en temps normal bloqué par un ion Mg^{2+} . Quand les stimuli non-conditionné et conditionné sont correctement associés, cependant, le neurone moteur génère un train de potentiels d'action. Ces potentiels d'action dépolarisent la membrane du neurone moteur, expulsant ainsi l'ion Mg^{2+} . Il en résulte un afflux de Ca^{2+} dans la cellule post-synaptique, qui active une série de phénomènes moléculaires et dont l'une des conséquences est la production d'un messager rétrograde qui par feed back active la libération pré-synaptique de neurotransmetteurs.

Ces études nous apprennent que les aspects élémentaires des divers processus de mémoire non-déclarative se trouvent dans les multiples facettes d'une synapse individuelle, dans les propriétés des connexions synaptiques individuelles. Il sera donc intéressant de se tourner vers les formes de mémoire déclarative pour voir jusqu'à quel degré ces formes plus complexes de mémoire peuvent être expliquées en terme de simples mécanismes synaptiques, lesquels mécanismes pourraient représenter des cibles pour le plomb, expliquant ainsi par quels moyens il altère l'apprentissage et la mémoire.

2 – Mémoire explicite ou non-déclarative

Contrairement à la mémoire implicite qui ne réside que dans la plasticité des circuits préexistants dans les zones mises en jeu par le stimulus, la mémoire déclarative fait intervenir le système du lobe médial temporal, nécessaire au moment de l'apprentissage et qui demeure crucial pendant une période longue mais limitée de stabilisation et de réorganisation, jusqu'à ce que les ultimes représentations à long-terme soient établies dans les différentes aires du cortex cérébral.

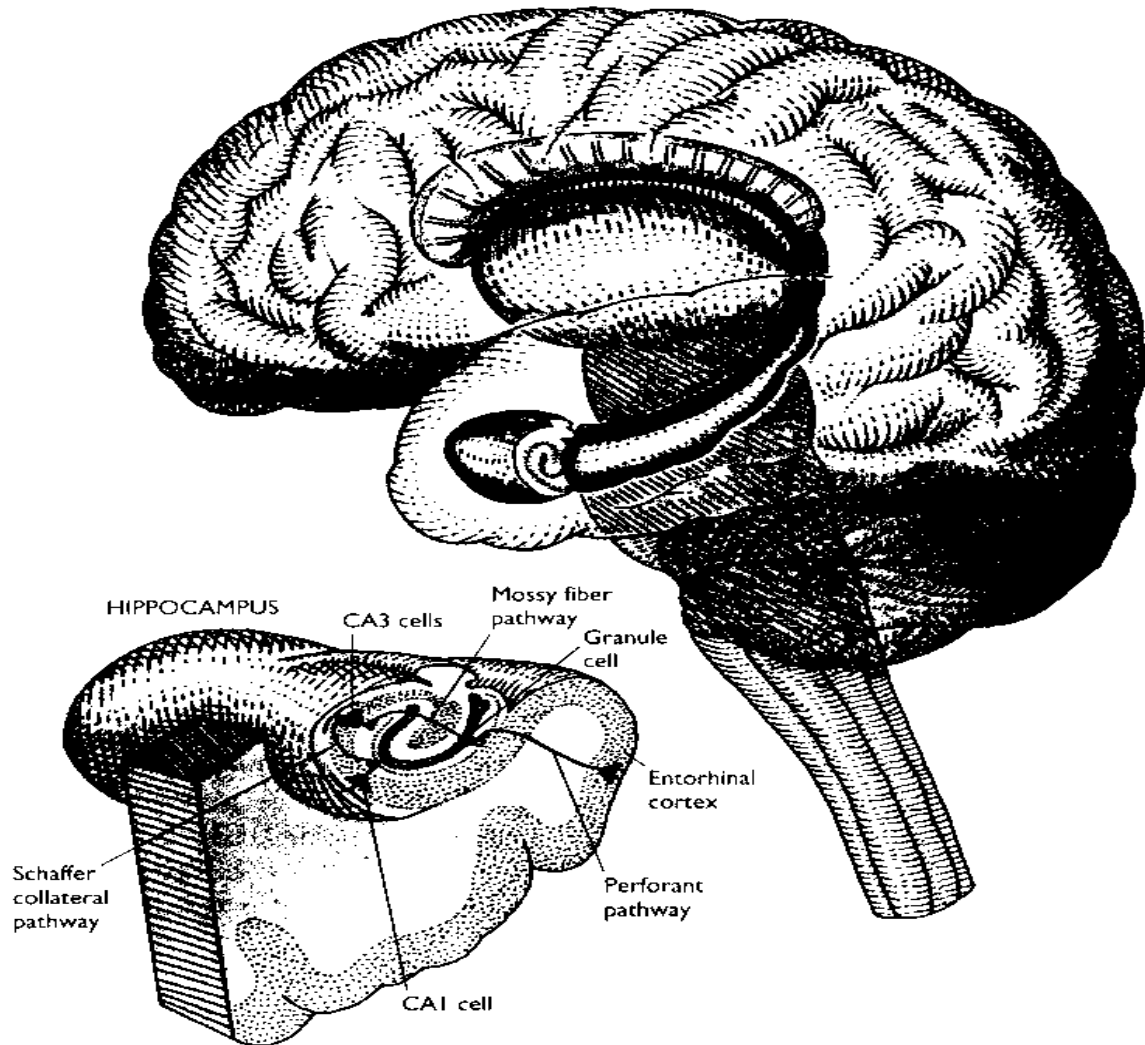
La plus grande partie de ce que nous savons sur les mécanismes de stockage à long-terme de la mémoire déclarative vient des études sur une région particulière de ce système, l'hippocampe.

En 1973, Bliss et Lomo trouvèrent qu'une brève activité électrique à haute fréquence appliquée artificiellement à une voie nerveuse de l'hippocampe produit une augmentation de l'activité synaptique qui dure quelques heures chez un animal anesthésié et pourrait si elle était répétée, durer pendant des jours, voire des semaines chez un animal éveillé et libre. Ce type de facilitation est maintenant appelée potentiation à long-terme (LTP). Plusieurs caractéristiques font de la LTP un possible mécanisme de stockage : d'abord elle survient dans chacune des trois principales voies qui acheminent l'information dans l'hippocampe (cf. fig. 2) ; ensuite, elle est rapidement induite : un seul train de stimuli électriques haute-fréquence suffit à doubler la force d'une connexion synaptique ; enfin, une fois induite elle est stable pour une ou plusieurs heures.

Que la LTP ait les caractéristiques d'un processus idéal de mémorisation ne prouve pas que ce soit le mécanisme réellement mis en œuvre. Cependant, si c'est le cas, c'est alors un sujet d'étude majeur, car il peut être étudié et produit en laboratoire.

Les mécanismes d'induction de la LTP peuvent être différents. On distingue la LTP associative et non-associative.

Figure 2 : Présentation des composantes de l'hippocampe humain.



Légende : L'hippocampe se trouve dans les profondeurs de la portion médiale du lobe temporal. L'information y parvient et le traverse au moyen de trois principales voies nerveuses, indiquées sur cette coupe : la voie perforante, qui va du cortex entorhinal aux cellules granuleuses du gyrus denté ; la voie des fibres moussues, qui va des cellules granuleuses du gyrus denté aux cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe ; et la voie collatérale de Schaffer, qui va de la région CA3 à la région CA1.

Source : LR Squire et ER Kandel, Memory, from mind to molecules. 2000.

A – LTP dans la voie des fibres moussues

Ce trajet nerveux relie le gyrus denté (DG) aux neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe. Comme la facilitation durant la sensibilisation des neurones sensitifs d'Aplysia, cette LTP est non-associative, c'est à dire qu'elle ne dépend pas d'une activité post-synaptique concomitante. Cette forme de LTP ne dépend que d'une salve brève et à haute fréquence d'activité neurale dans les neurones pré-synaptiques, suivie d'un afflux de calcium. Celui-ci active une adényl-cyclase calcium-calmoduline-dépendante qui accroît alors le taux d'AMPc, activant ainsi la PKA qui phosphoryle diverses protéines. Cependant, le rôle dans la mémoire de cette forme de LTP est peu clair, et il existe une meilleure corrélation entre la mémoire déclarative et la LTP dans une autre voie nerveuse : la voie collatérale de Schaffer.

B – LTP dans la voie collatérale de Schaffer

Ce trajet nerveux correspond aux axones envoyés par les cellules de la région CA3 jusqu'à la région CA1. Ici, la LTP n'est pas induite tant que le récepteur NMDA de la cellule post-synaptique n'est pas activé. Nécessitant une activité pré et post-synaptique concomitante, cette forme de LTP est dite associative.

Des salves de potentiels d'action pré-synaptiques haute fréquence dépolarisent la membrane post synaptique, débloquent le récepteur NMDA d'où un afflux de calcium qui active la protéine kinase calcium-calmoduline-dépendante (CaMKII), la protéine kinase C (PKC), la PKA, et une tyrosine kinase. Il s'ensuit une phosphorylation de nombreuses protéines cibles, ce qui a de multiples conséquences. (Izquierdo et Médina, 1997)

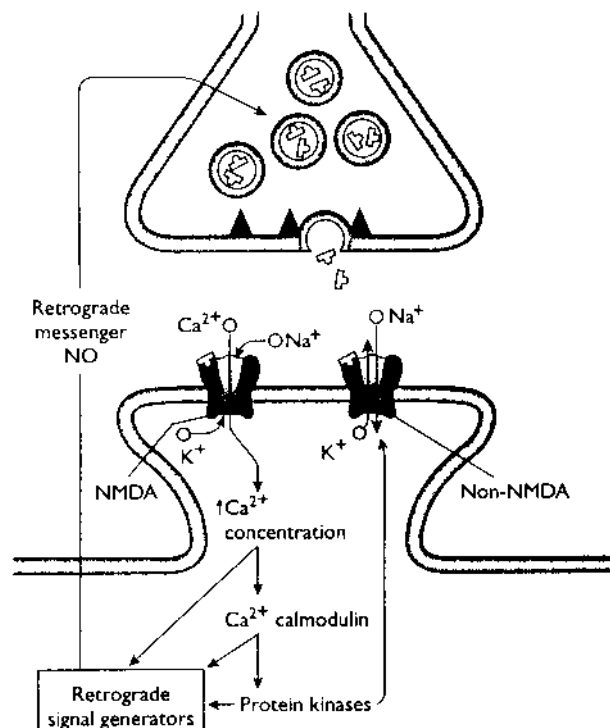
PKC, comme le calcium, stimule l'adényl cyclase et donc la synthèse d'AMPc, qui jouera un rôle crucial dans l'activation de PKA et le déclenchement d'une cascade d'événements à la base de la mémoire à long-terme. De plus PKC, bien que son rôle dans la formation de la mémoire ne soit pas encore éclairci, phosphoryle la protéine pré-synaptique GAP-43, impliquée dans les changements morphologiques synaptiques activité-dépendants.

La phosphorylation par CaMKII de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA augmente l'affinité des récepteurs AMPA. De plus, on note une augmentation de la densité des récepteurs AMPA au niveau de l'extrémité de la dendrite. CaMKII assure également la phosphorylation de diverses protéines importantes dans la plasticité synaptique dont les neurofilaments et autres protéines de structure. Elle agit dans tous ces cas concomitamment avec PKA, bien qu'elles aient des sites d'action et des effets différents.

Il apparaît clairement qu'il existe un ou des messagers rétrogrades (oxyde nitrique, monoxyde de carbone, platelet activating factor ?) qui réguleraient la libération pré synaptique de glutamate dans la phase précoce de formation de la mémoire.

Ces événements, repris dans la figure 3, pourraient être modulés selon le climat émotionnel dans lequel ils ont lieu, notamment, véhiculés par l'amygdale et le septum médial, l'anxiété, la vigilance ou l'aversion. En effet, la formation de la mémoire est très sensible à une inhibition par les récepteurs GABA et à une modulation par les récepteurs cholinergiques muscariniques et β -noradrénergiques.

Figure 3 : Induction et maintien de la LTP dans les cellules post synaptiques.



Légende : La LTP est supposée fonctionner selon un nouveau type de communication entre cellules nerveuses. Selon cette hypothèse, quand les canaux NMDA sont ouverts dans la cellule post synaptique au moment où LTP est induite, l'afflux consécutif de calcium dans la cellule post synaptique et l'activation de la CaM kinase II et autres protéines kinases qui en résulte sont censés, non seulement modifier la cellule post synaptique en activant les récepteurs AMPA, mais aussi envoyer un ou plusieurs messagers rétrogrades vers la cellule pré synaptique afin qu'elle libère à son tour davantage de transmetteurs.

Source : LR Squire et ER Kandel, *Memory, from mind to molecules*. 2000.

C – LTD, l'autre face de LTP

Durant le développement postnatal, l'hippocampe subit des modifications qui pourraient être à l'origine des différences relevées dans la fonction synaptique et le comportement. Parmi ces changements, on note une réduction de l'activité des synapses dans l'aire CA1 et l'incapacité à maintenir une potentiation synaptique. Par exemple, la vitesse de déclin des LTP accélère avec l'âge. Cela pourrait refléter un accroissement des mécanismes visant à déprimer activement les synapses potentialisées. Un processus candidat à cette régulation de la durée de LTP est la dépression à long-terme ou LTD (Sui et al., 2000a). Dans l'hippocampe, des stimulations basse fréquence prolongées (LFS, 1 à 10 Hz) de trajets excitateurs mono synaptiques résultent en une diminution durable de la transmission synaptique, la LTD. Des témoignages récents indiquent que LTD est spécialement développée chez les nouveau-nés, alors qu'elle est de faible amplitude, voire inexistante chez les animaux adultes dans l'aire CA1. Wagner et Alger* suggèrent que ces différences dans l'induction de LTD liées au développement résultent de la maturation des mécanismes inhibiteurs, qui à leur tour moduleraient la fonction des récepteurs NMDA. L'inhibition post synaptique par GABA des cellules pyramidales de CA1 augmente avec la maturation. C'est l'inverse dans le gyrus denté, où on relève une augmentation significative de l'amplitude de LTD avec l'âge. Cela pourrait être lié à un processus calcium-dépendant dans l'induction de LTD dans le gyrus denté. Un faible accroissement de l'afflux de calcium intracellulaire ou une activité augmentée d'un second messager calcium-dépendant pourrait modifier la susceptibilité à induire LTD.

Il existe différentes façons d'induire LTD, qui ont été regroupées en trois catégories (Christie et al., 1994) : LTD hétéro synaptique, associative et homo synaptique. Cette dernière étant plus facilement reproductible (Bear et Malenka, 1994), c'est à son sujet que les connaissances sont les plus importantes. Il semblerait que LTD homo synaptique dans l'aire CA1 requiert l'activation du récepteur NMDA et une élévation de la concentration intracellulaire de calcium, mais plus modeste que dans le cas de LTP, et qui de ce fait activerait sélectivement les phosphatases de protéines, alors qu'une élévation plus importante comme pour LTP aurait activé les protéines kinases (Bear, 1996).

Concernant les modalités d'induction de LTD, une étude (Sui et al, 2000b) menée sur des rats de 26 à 30 jours a montré l'égale importance dans l'induction de LTD dans l'aire CA1 des récepteurs NMDA et des canaux calcium voltage-dépendants de type L, alors que dans le gyrus denté, où sont requis récepteurs NMDA et canaux calcium voltage-dépendants de type L et T, ces derniers jouent un rôle prépondérant.

D – De la mémoire à court-terme à la mémoire à long-terme

La persistance de la mémoire, qu'elle soit implicite ou explicite, est liée au nombre et à l'intensité des essais, et est communément divisée en deux composants temporellement distincts, la mémoire à court-terme et la mémoire à long-terme. Alors que la première, labile, ne requiert que la modification covalente de protéines pré existantes et la modulation de la force des connexions pré existantes, la seconde, comme on va le voir, nécessite l'activation de gènes, la synthèse de nouvelles protéines et la croissance de nouvelles connexions synaptiques. (Chen et Tonegawa, 1997)

Les premières avancées sur ce sujet furent faites à l'occasion de travaux sur l'escargot *Aplysia* par Baabiyen et al. (1997) et

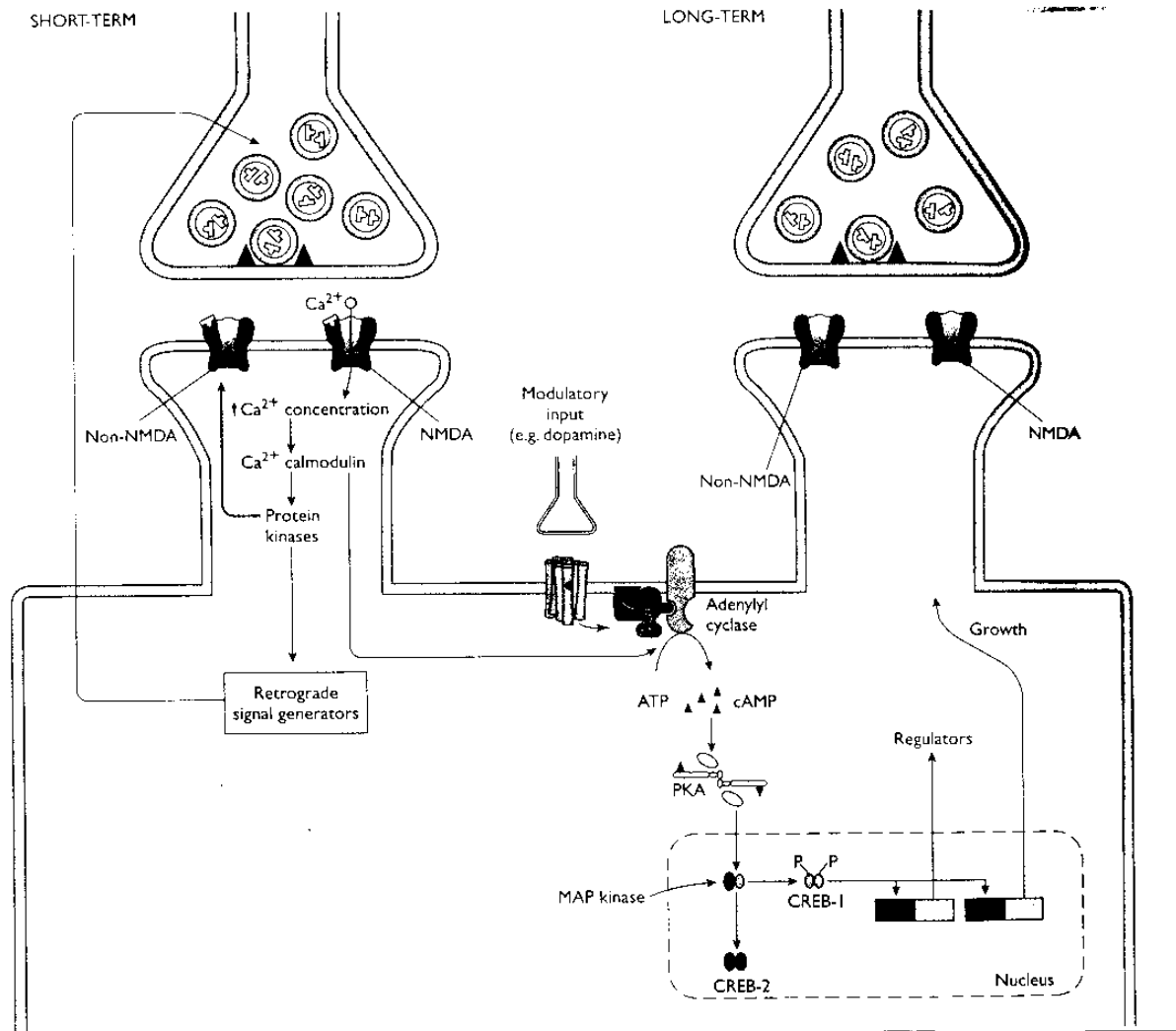
Légende : La sensibilisation à long-terme du réflexe de retrait des lamelles chez *Aplysia* est initiée par l'activation répétée des neurones sensitifs par les interneurons modulateurs sérotoninergiques. Ceci conduit à deux séries majeures de changements génétiquement induits dans les neurones sensitifs à la base de ce réflexe : (1) l'activité persistante de PKA et (2) la croissance de nouvelles connections synaptiques.

Un pulse unique de sérotonine, à l'origine de la facilitation à court-terme, ne produit qu'une élévation transitoire du taux d'AMPc, qui ne libère les sous-unités catalytiques de PKA que quelques minutes. Lors de pulses répétés de sérotonine, le taux d'AMPc augmente au point que les sous-unités catalytiques de PKA sont libérées assez longtemps pour qu'un nombre conséquent d'entre elles soit transloqué dans le noyau. Là, elles phosphorylent des facteurs de transcription dont le plus important est une protéine appelée CREB-1 (cAMP response element binding protein), qui se lie à l'ADN et active les gènes responsables de la persistance de la mémoire, à condition que la MAPK (mitogen activated protein kinase), elle-même activée par PKA, ait déplacé le répresseur CREB-2. Les gènes alors activés appartiennent à une classe spéciale de gènes appelés « immediate early genes », activés rapidement et transitoirement. Chez *Aplysia*, l'un d'entre eux code pour une protéine, l'ubiquitine hydrolase, qui détruit les sous-unités régulatrices de PKA, qui est alors activée même quand le taux d'AMPc retourne à la normale. Un autre de ces gènes est le régulateur de transcription C/EBP, qui à son tour active une cascade d'événements auto-entretenus essentielle pour la phase tardive de la facilitation à long-terme, dite de stabilisation. Le résultat est la croissance de nouvelles connexions synaptiques, notamment par l'internalisation des molécules d'adhésion des cellules neurales (NCAM), qui permet un remodelage de l'architecture.

Source : LR Squire et ER Kandel, Memory, from mind to molecules. 2000.

Ces mécanismes paraissent également en partie valables pour la mémoire plus complexe, explicite, des mammifères (Izquierdo et Medina, 1997). Ainsi le passage à la phase tardive de LTP suite à des trains répétés de stimulation, représentée dans la figure 5, se fait par une augmentation du taux d'AMPc, suivie d'une activation de PKA et de CREB-1, qui mènent finalement à l'activation d'un assortiment d' « immediate early genes » codant pour des protéines essentielles à la croissance de nouvelles connexions synaptiques (dont L1 et NCAM) (Lüthi et al., 1994).

Figure 5 : Modèle des phases précoces et tardives de LTP.



Légende : Un train unique de stimulation conduit à l'activation de la LTP précoce en activant les récepteurs NMDA et l'afflux de Ca^{2+} dans la cellule post synaptique. Le calcium se combine à la calmoduline pour activer une série de protéines kinases seconds messagers qui servent d'intermédiaires pour au moins deux fonctions. D'abord, les kinases phosphorylent les canaux des récepteurs AMPA, accroissant ainsi la sensibilité de ces récepteurs post synaptiques au glutamate. De plus, on suppose que ces kinases activent une série d'enzymes qui génèrent des signaux rétrogrades à destination des terminaux du neurone pré synaptique, qui amplifie la libération de transmetteurs. Lors de trains répétés, l'afflux de calcium stimule également l'adenylyl cyclase. Cette enzyme active PKA, qui se transloque dans le noyau où on suppose qu'elle phosphoryle CREB. CREB à son tour active des cibles qui sont des régulateurs et des effecteurs de croissance, ce qui conduit à des changements structuraux.

Source : LR Squire et ER Kandel, *Memory, from mind to molecules*. 2000.

E – Conclusion

LTP et LTD sont des phénomènes de laboratoire, induits de manière artificielle. Aussi ne pouvons-nous pas affirmer qu'ils sont le véritable reflet de la mémorisation. Certaines expériences vont dans ce sens, prouvant que des paramètres altérant LTP altèrent également la mémoire déclarative, notamment spatiale.

Au contraire, des auteurs (Hölscher, 1999), au vu de certains résultats contradictoires, s'interrogent sur les conditions actuelles d'étude de LTP, qu'ils dénoncent comme trop artificielles, biaisées par le stress des animaux et la multiplicité des protocoles.

Bien qu'il n'existe pas de certitudes comme quoi la mémoire est stockée sous forme de LTP, ce postulat a été très heuristique ces dernières années car il a amené à la démonstration des principales étapes impliquées dans la formation de la mémoire dans l'hippocampe du rat et dans d'autres formes de plasticité très similaires aux différentes formes de LTP. On peut donc s'attendre à ce que dans beaucoup de situations dans lesquelles l'hippocampe est requis pour maintenir la stimulation de la fonction synaptique, il utiliserait des processus biochimiques semblables. Quant à la mémoire persistant plus longtemps pour laquelle des structures corticales de mémorisation autres que l'hippocampe sont en cause (cortex entorhinal, pariétal postérieur...), il est plus sage de penser que ce seraient par des mécanismes différents de LTP, comme des changements de l'adhésion synaptique suite à une activité neuronale, passant par des mouvements de glycoprotéines et suivis de changements morphologiques (Izquierdo et Medina, 1997).

Les mécanismes biochimiques sur lesquels repose l'élaboration des processus d'apprentissage ayant été développés, il est maintenant possible de s'intéresser à la manière dont une exposition chronique au plomb affecte les phénomènes de LTP et LTD, puis plus précisément aux interactions mises en jeu à l'échelle moléculaire.

II – Incidence d'une exposition précoce au plomb sur les mécanismes à la base de l'apprentissage et de la mémoire

Comme on l'a vu, les études épidémiologiques ont à maintes reprises souligné le lien entre une exposition chronique au plomb pendant le développement et la détérioration des fonctions cognitives et de la maturation du comportement chez les jeunes enfants. En accord avec ces études sur les enfants, les investigations mettant en jeu des animaux ont indiqué qu'une exposition précoce au plomb est responsable de déficits comportementaux dans des tâches variées. Ces similitudes entre travaux sur l'homme et l'animal ont été accentuées par l'étude des processus complexes de cognition et d'apprentissage. De plus, les plus bas niveaux d'exposition pour lesquels des effets ont été observés dans ces études sont similaires quelque soit l'espèce : - 10 à 15 µg/dl sang chez l'enfant, - >15 µg/dl chez les primates, - > 20 µg/dl chez les rongeurs.

Ces observations comportementales reposent sur les effets fonctionnels du plomb au niveau du système nerveux central, qu'on s'est attaché à décrire à travers des modèles animaux, notamment en ce qui concerne les changements induits par le plomb dans la plasticité synaptique. Les études ont donc porté sur les effets d'une faible exposition chronique au plomb au cours du développement sur LTP, LTD, et les composants glutamatergiques qui les sous-tendent.

1 – Conséquences d'une exposition au plomb sur LTP

Les résultats des investigations sur les effets neurophysiologiques d'une exposition chronique au plomb ont été remarquablement cohérents (Lasley et Gilbert, 2000).

Il n'a été observé aucun changement dans les mesures des lignes de base des potentiels, comprenant le potentiel post synaptique excitateur (PPSE) auquel se surimpose le « population spike », évoqués par une stimulation à un seul pulse, quel que soit le niveau d'exposition au plomb. Cependant, LTP nécessite des schémas de stimulation plus complexes pour être induite. Les résultats des études sur l'influence du plomb sur ce modèle s'accordent en général. Sur la quinzaine d'articles publiés, tous sauf un ont détecté un effet du plomb sur LTP. De plus, dans les études qui se focalisent sur les effets sur LTP dans les régions CA1 et du gyrus denté de l'hippocampe, toutes décrivent unanimement que l'exposition au plomb diminue la potentiation. Un récapitulatif de ces articles regroupés par sous-région de l'hippocampe est fourni par le tableau V.

Tableau V : Exposition chronique au plomb et LTP: conclusions des études à ce sujet.

Site étudié dans l'hippocampe	Période d'exposition ¹	Plombémie (en µg/dL)	Préparation	Effet de l'exposition sur LTP
Gyrus denté				
Lasley et al., 1993*	P0-P85-105	37.5	<i>In vivo</i>	Induction altérée
Gilbert et al., 1996*	P0-P90-120	37.2	<i>In vivo</i>	Seuil d'induction plus élevé
Ruan et al., 1998	P0-P90-115	30.1	<i>In vivo</i>	Amplitude diminuée
Gilbert et al., 1999a	G16-P130-210	40.2	<i>In vivo</i>	Seuil d'induction plus élevé et amplitude diminuée
	P30-P130-210	38.7		
Gilbert et al., 1999b	G16-P120-180	26.8 ²	<i>In vivo</i>	Seuil d'induction plus élevé et amplitude diminuée
		40.2		
		61.8		
Gilbert et Mack, 1998*	G16-P210-540	ND	<i>In vivo</i>	Déclin accéléré
Région CA1				
Altmann et al., 1993*	G0-P70-210	14.3	Coupes	Bloquée
Grover et Frye, 1996*	56-70 jours ³	24.1	Coupes	Bloquée lors de fort tetanus
Zaiser et Miletic, 1997*	G16-P91	31.5	<i>In vivo</i>	Amplitude diminuée
Xu et al., 1998*	P0-P21	30.1	Coupes	Amplitude diminuée
Gutowsky et al, 1998	G0-P90-130	16.0	Coupes	Amplitude diminuée
Zhao et al., 1999*	P0-P50-65	30.1	Coupes	Amplitude diminuée
Région CA3				
Gutowsky et al., 1997	G0-P13-140	28.5	Coupes	Pas d'effet à 4 âges différents
Xu et al., 1998*	P0-P21	30.1	Coupes	Amplitude augmentée
Gutowsky et al, 1998	G0-P90-130	16.0	Coupes	Pas d'effet
Hussain et al., 2000	G0-P30	68.8	<i>In vivo</i>	Amplitude diminuée
	G0-P60	31.4		Amplitude augmentée

- 1) Durée d'exposition en terme de jours d'âge pendant la gestation (G) ou en période postnatale (P) ; P0 = jour de la naissance.
 - 2) Ces différentes plombémies sont générées par différents taux d'exposition.
 - 3) Durée de l'exposition chez de jeunes rats adultes, l'âge n'étant pas rapporté.
- * Références non disponibles dans la bibliographie.

Source : S. Lasley et M. Gilbert / *Neurotoxicology* 21 (2000) 1057-1068.

Trois actions distinctes d'une exposition chronique au plomb sur les mesures de LTP ont été identifiées. Il paraît bien établi qu'une exposition au plomb augmente le seuil d'induction de LTP et diminue l'amplitude de la potentiation (Gilbert et al., 1999), mais cette exposition raccourcit également la durée de LTP en accélérant son taux de déclin (Gilbert et Mack, 1998).

D'autres travaux ont par la suite examiné la façon dont cet effet du plomb sur LTP varie en fonction de la période d'exposition au cours du développement et de l'importance de l'exposition. Altmann et al. ont rapporté qu'une exposition continue

depuis la conception, ou bien une exposition qui entoure la période postnatale précoce et de gestation, affaiblit LTP mesurée dans l'aire CA1 des coupes d'hippocampe d'animaux adultes. Cependant, une exposition continue débutant au 16^{ème} jour postnatal (PN16) n'occasionne pas de déficits visibles chez le rat adulte, suggérant qu'une exposition durant le développement précoce est critique pour un affaiblissement induit par le plomb de LTP. D'un autre côté, Gilbert et al. (1999a) ont exposé des rats en continu, débutant juste avant la naissance ou 10 jours après le sevrage. Ils rapportent pour chaque groupe les mêmes décréments induits par le plomb de l'amplitude de LTP et les mêmes augmentations du seuil d'induction dans le gyrus denté d'animaux adultes. Ces deux études diffèrent par la région de l'hippocampe étudiée (CA1 vs gyrus denté) et par la préparation expérimentale (*in vivo* vs *ex vivo*). Il est possible que le fait de commencer l'exposition dès la conception (Altmann et al., 1993*) produise un effet plus discernable que lors d'une exposition débutant plus tard dans la gestation (Gilbert et al., 1999a) quand le plomb est arrêté au sevrage. Le plus faible niveau d'exposition (16µg/dl sang) présent dans l'étude d'Altmann comparé à celui de Gilbert (39µg/dl sang) peut aussi expliquer l'incapacité du premier groupe à détecter un effet d'une exposition continue à partir de PN16. En effet, l'hippocampe pourrait être moins sensible au plomb quand l'exposition débute aux alentours de la période du sevrage, d'où l'absence d'effet d'une faible exposition. Cependant, Grover et Frye (1996) rapportent également des réductions de LTP dans la région CA1 chez des animaux exposés après le sevrage et atteignant des plombémies intermédiaires (24µg/dl).

Prises ensemble, ces observations suggèrent que LTP est davantage affectée par le plomb durant le développement précoce, mais qu'une exposition commencée après le sevrage peut aussi réellement affecter la plasticité synaptique.

Les investigations sur les effets dose-dépendants du plomb sur LTP n'ont pas produit les résultats escomptés. Gilbert et al. (1999) ont exposé des rats de façon continue à différents taux de plomb depuis la naissance jusqu'à la quantification des réponses à une stimulation tétanique vers 3 à 4 mois. Des groupes séparés ont reçu 0, 0.2%, 0.5% ou 1% de plomb dans leur eau de boisson, d'où des plombémies de 2, 27, 40, 62 et 118 µg/dl, respectivement. Une nette diminution de l'amplitude de LTP est visible pour les groupes à 0.1 et 0.2 % de plomb, alors qu'on remarque l'absence d'un quelconque effet pour le groupe à 1% de plomb, **définissant ainsi une relation dose-effet biphasique**. Cette tendance est retrouvée lorsqu'on se penche sur les effets de différents degrés d'exposition au plomb sur le seuil d'induction de LTP. De telles relations ne peuvent pas être expliquées par une excrétion accrue ou par une distribution altérée du plomb dans les tissus car les concentrations en plomb du sang et du cerveau augmentent de manière dose-dépendante. Néanmoins, cette fonction dose-effet en forme de U a été rapportée, concernant l'exposition au plomb, dans d'autres schémas expérimentaux impliquant des mesures physiologiques ou comportementales (Davis et Svendsgard, 1990*), à la fois chez des animaux (Cory-Slechta, 1984*) et chez des hommes (Bleeker et al., 1997*).

Les choses sont un peu différentes en ce qui concerne LTP dans la région CA3 de l'hippocampe, qui ne fait pas intervenir le récepteur NMDA. Hussain et al. (2000), après une exposition chronique des rats pendant la gestation et la lactation, constate qu'à PN30, le plomb inhibe LTP, tandis qu'il la potentialise à PN60. Ces observations sont en partie corroborées par Xu et al., 1998, pour qui à PN60 le plomb accroît l'amplitude de LTP. Le fait que Gutowski et al. (1997 ; 1998) ne distinguent aucun effet du plomb sur LTP dans CA3 peut venir de leur protocole d'induction qui est différent et du fait qu'ils utilisent l'amplitude de la « population spike » comme mesure de LTP plutôt que la pente des PPSE, qui est plus pertinente.

2 – Conséquences d'une exposition au plomb sur LTD

Comparé à LTP, LTD, l'autre acteur de la plasticité synaptique a été beaucoup moins étudié. Cependant dernièrement l'équipe de Sui et al. (1999, 2000a, 2000b) s'est penchée sur les effets d'une exposition pendant la lactation à un faible taux de plomb sur la LTD de rat âgés de 50 à 65 jours.

Les résultats de leurs travaux sont rapportés dans le tableau VI.

Tableau VI : Exposition chronique au plomb et LTD : conclusions des études à ce sujet.

Site étudié dans l'hippocampe	Période d'exposition	Plombémie (en µg/dL)	[Pb] dans cerveau (en ng/g)	Effet du plomb sur LTD
Région CA1				
Sui et al., 1999	P0-P21	30.1	776	Induction inhibée, amplitude diminuée Diminution de l'amplitude, moins marquée avec l'âge Induction inhibée via effet négatif sur NMDA et canaux Ca voltage-dep.
Sui et al., 2000a	P0-P21	ND	364 225 78	
Sui et al., 2000b	P0-P21	36.4	776	
Gyrus denté				
Sui et al., 1999	P0-P21	30.1	776	Induction inhibée, davantage que dans CA1 Diminution de l'amplitude, plus marquée avec l'âge. Altère NMDA et surtout canaux Ca voltage-dep.
Sui et al., 2000a	P0-P21	ND	364 ¹ 225 78	
Sui et al., 2000b	P0-P21	36.4	776	

1) Teneurs en plomb mesurées respectivement à 30, 40, et 60 jours.

Source : Informations provenant des articles sus-nommés et rassemblées sous forme de tableau.

Dans la région CA1 de l'hippocampe, l'amplitude moyenne de la pente des PPSE après une salve de stimuli basse fréquence (1 Hz, 15 mn) diminue beaucoup plus chez les animaux témoins que chez les animaux exposés au plomb. Dans le gyrus denté (DG), la même stimulation induit LTD chez les rats témoins alors qu'elle échoue à l'induire chez les rats exposés où on ne note aucune diminution de la pente des PPSE. **Ainsi une exposition précoce au plomb diminue l'amplitude de LTD dans l'aire CA1 et dans le gyrus denté** (Sui et al., 1999).

Ayant constaté l'évolution de LTD au cours du temps (diminue dans CA1, augmente dans DG), on peut également s'interroger sur l'évolution des effets du plomb sur LTD avec l'âge (Sui et al., 2000a). On s'aperçoit alors que chez des rats âgés d'environ 30, 40, ou 60 jours, une exposition au plomb freine toujours l'induction de LTD dans la région CA1 et DG. Cependant on relève une sensibilité différente à cette exposition selon l'âge : dans CA1, la diminution de l'amplitude de LTD liée au plomb décroît avec le développement alors qu'elle s'accroît dans le DG. **Cet effet est donc durable, bien qu'évoluant différemment dans CA1 et DG.**

3 – Conclusion sur les effets du plomb sur LTP et LTD

Ainsi, les travaux sur les actions d'une exposition chronique au plomb sur LTP et LTD dans l'hippocampe ont fourni une importante quantité d'informations, qui tendent de manière générale à prouver **qu'une exposition précoce au plomb amoindrit les phénomènes de potentiation et de dépression de l'activité synaptique à long-terme.**

Et quand les effets de cette exposition sur la plasticité synaptique sont comparés aux effets du plomb sur l'apprentissage chez les jeunes enfants, des parallélismes apparaissent. Les effets sur la physiologie neuronale et ceux sur l'apprentissage sont tous deux difficiles à observer, requérant des procédés de tests sophistiqués pour les mettre en évidence : la physiologie synaptique de base n'est pas altérée chez les animaux exposés, et seules les réponses, comme LTP et LTD, à des schémas de stimulation plus complexes dévoilent clairement des différences ; les problèmes de comportement et d'apprentissage induits par le plomb chez l'enfant n'ont été typiquement documentés qu'à partir de questionnaires détaillés ou d'analyses statistiques extensives des covariables. De plus, les effets révélés par les mesures de LTP pourraient suggérer que les enfants exposés au plomb puissent éprouver davantage de difficultés à assimiler durablement ce qu'ils apprennent, ce qui est cohérent avec les dysfonctionnements observés.

S'il est avéré que LTP et LTD constituent des modèles efficaces pour étudier les processus d'apprentissage et de mémorisation, alors des investigations sur les effets du plomb sur les processus sous-tendant ces modèles peuvent fournir des explications à la réduction des capacités cognitives des enfants exposés précocement au plomb.

4– Quelques mécanismes pouvant expliquer les effets du plomb sur LTP et LTD

Bien que les mécanismes sur lesquels repose l'amoindrissement de LTP et LTD induit par une exposition pendant le développement à de faibles ou moyennes concentrations au plomb ne soient pas connus, trois actions majeures du plomb ont été identifiées qui pourraient éventuellement contribuer à faire échec au processus de LTP :

- L'inhibition par le plomb de la libération de glutamate suite à une dépolarisation.
- L'interaction du plomb avec la protéine kinase C.
- Les altérations dues au plomb des propriétés fonctionnelles des récepteurs post-synaptiques NMDA.

A – Modulation par le plomb de la libération de glutamate.

Les évaluations de la fonction pré synaptique des synapses glutamatergiques ont récemment conduit à des résultats qui peuvent être reliés aux effets du plomb sur LTP. La stimulation des fibres perforantes en vue d'induire une facilitation à pulse couplé dans le gyrus denté, qui repose en premier lieu sur une libération accrue de glutamate, montre que celle-ci est réduite chez des animaux dont la plombémie est de l'ordre de 30 à 40 µg/dl (Lasley et Gilbert, 1996 ; Ruan et al., 1998). De plus, cet effet ne peut pas être attribué à une action du plomb sur les récepteurs NMDA (Lasley et Gilbert, 1996).

On a également démontré qu'une plombémie de cet ordre a pour résultat une diminution de la libération de glutamate induite par dépolarisation dans l'hippocampe, d'après des mesures par micro dialyse sur des animaux éveillés (Gilbert et Lasley, 1996 ; Lasley et al., 1999). Au glutamate libéré des vésicules par dépolarisation s'ajoute le glutamate extracellulaire émanant d'autres sources, dont la libération spontanée depuis les neurones et la glie. Lasley et Gilbert (1996) ont utilisé une perfusion focale concentrée en K^+ pour mesurer la libération de glutamate dans l'hippocampe et en définir les composantes calcium-dépendante et calcium-indépendante par l'ajout ou le retrait du calcium du fluide perfusé. Alors qu'une exposition chronique à 0.2% de plomb diminue l'augmentation stimulée par K^+ du glutamate extracellulaire total (calcium-dépendant et indépendant), il n'existe pas de différences entre animaux témoins et exposés en l'absence de calcium. Cela nous révèle que la diminution observée de la libération de glutamate chez les animaux exposés est due à un décrétement par le plomb de la composante calcium-dépendante.

Cette action du plomb est corroborée par les travaux de Braga et al. (1999) qui montrent que l'ajout de Pb^{2+} (>10nM) à une culture de neurones de l'hippocampe bloque réversiblement la libération tétrodoxine-sensible de glutamate et de GABA, comme le prouve la réduction de l'amplitude et de la fréquence des courants post synaptiques évoqués par le glutamate et GABA. Cet effet, non lié à un changement de l'activité des canaux sodium, est probablement lié à une action du

plomb sur des cibles extracellulaires, probablement la liaison aux canaux calcium voltage-dépendants.

Ces faits ont été confirmés dans une étude examinant de quelle manière cette action du plomb sur la libération de glutamate par dépolarisation varie selon la période de développement pendant laquelle a lieu l'exposition au plomb (Lasley et al., 1999). Des rats sont exposés en continu depuis la conception (groupe GL) ou depuis le dixième jour après le sevrage (groupe WL) et testés à l'âge adulte (plombémie respectivement de 39 et 45 µg/dl). Une semblable diminution par le plomb de la libération de glutamate calcium-dépendante est observée dans les deux groupes. Le mécanisme sous-tendant cet effet n'est pas encore défini. On peut envisager une diminution de l'entrée de Ca^{2+} via les canaux calcium voltage dépendants, prouvée à des concentrations de plomb de l'ordre de 1 µM. On a également évoqué une prévention à des concentrations nanomolaires de plomb d'une activation maximale de PKC. Que l'exposition ait lieu durant le développement précoce n'est clairement pas un pré requis. De plus, comme dans le cas de LTP, un effet plus faible mais significatif sur la libération calcium-dépendante a aussi été découvert chez des rats exposés uniquement de la conception au sevrage (groupe GW), et dont la plombémie mesurée à l'âge adulte ne différait pas de celle des rats témoins. Cette observation suggère un décrétement Pb-induit de la synaptogénèse. Ainsi, de multiples mécanismes dépendant du stade de développement semblent exister à ce niveau et cette durée d'exposition concernant la libération de glutamate.

Pour pousser plus loin l'élucidation de la nature des effets du plomb sur la fonction glutamatergique pré synaptique et leurs rapports avec les constatations sur LTP, la libération de glutamate K^+ -stimulée fut aussi déterminée en fonction du niveau d'exposition chronique (Lasley et al., 1998). Les rats ont été exposés à différents niveaux de plomb depuis la naissance jusqu'au moment du test à l'âge adulte. Ils ont reçu 0.1, 0.2, 0.5 ou 1 % de plomb dans leur eau de boisson, résultant en des plombémies de 0, 27, 39, 62 et 118 µg/dl, respectivement. Les résultats obtenus rappellent les résultats des études dose-effet des mesures de LTP. En effet, la libération de glutamate par dépolarisation est diminuée dans les groupes à 0.1 et 0.2%, mais n'est pas significativement différente des valeurs des contrôles dans les groupes à 0.5 et 1% , définissant encore une relation dose-effet biphasique. A des taux d'exposition plus élevés, l'action calcium-mimétique du plomb qui favorise la libération des transmetteurs (Shao et Suszkiw, 1991) pourrait surpasser l'action dépressive des plus faibles taux d'exposition.

Il existe donc des similitudes significatives entre les effets d'une exposition chronique au plomb sur la LTP dans l'hippocampe et ceux sur la libération de glutamate, qui permettent de penser que **la diminution de la libération de glutamate par dépolarisation suite à une exposition au plomb est un facteur contribuant significativement aux changements observés dans les mesures de LTP.**

B – Modulation par le plomb de l'activité de PKC

La protéine kinase C est impliquée dans la libération par exocytose de neurotransmetteurs supports de la transmission synaptique. Une augmentation de l'activation de PKC est associée à une augmentation de la libération pré synaptique de neurotransmetteurs, suite à l'induction de LTP. L'activation post synaptique de PKC est également critique pour l'expression de LTP.

Cette relation entre activation de PKC et induction de LTP a notamment été mise à profit par Hussain et al. (2000) pour étudier les effets d'une exposition chronique au plomb pendant le développement sur l'induction de LTP dans la région CA3 des fibres moussues, qui contrairement à LTP dans CA1 et DG ne dépend pas du récepteur NMDA. Il existe des arguments solides comme quoi l'activation de PKC est nécessaire à l'induction de LTP dans ces synapses, puisque des inhibiteurs de PKC bloquent l'induction de LTP. Le phorbol ester, un activateur non-spécifique des différents isozymes de PKC, induit une forte potentiation synaptique qui masque LTP, mais qui contrairement à LTP est réversible, indiquant que l'action de PKC est essentielle mais pas suffisante pour induire LTP. Ces faits sont mis à profit dans leur étude pour vérifier en quoi l'action du plomb sur PKC peut expliquer son effet sur LTP.

Chez des rats de 30 jours, le plomb inhibe CA3 LTP, alors qu'à l'âge de 60 jours, il la potentialise. En raison des rapports divergents selon lesquels PKC est tantôt activée tantôt inhibée par le plomb, il semble logique de tester si ce changement de sensibilité selon le stade de développement peut être dû à un changement dans l'activité de PKC. Pour cela, les effets du plomb sur la potentiation par le phorbol ester ont été déterminés : on constate les mêmes effets âge-dépendants du plomb que sur LTP. Cette potentiation plus importante chez les jeunes que chez l'adulte pourrait être le reflet d'une expression âge-dépendante des différents isozymes de PKC. En effet, il existe différentes isozymes de PKC, différant en particulier par leur dépendance au calcium. Les isoformes conventionnels (c-PKC), calcium-dépendants, incluent PKC α , β -I, β -II et γ . Ils nécessitent du calcium pour leur activation à la différence des nouveaux isoformes (n-PKC), PKC δ , ϵ et η . Enfin, il existe des isoformes atypiques (a-PKC), PKC ξ et λ , qui ne nécessitent ni calcium ni diacylglycérol pour leur activation.

L'action du plomb sur ces différents isoformes a été étudiée par Coppi et al. (1996), les résultats étant rapportés dans le tableau VII.

Tableau VII : Effet du plomb sur les différents isoformes de PKC.

Nature de l'isoforme	Effet du plomb	Concentrations actives (en M)
PKC	+	$10^{-13} < C < 4.10^{-4}$
PKC α	+	$5.10^{-11} < C < 4.10^{-4}$
PKC γ	Peu d'effet activateur	
PKC γ	-	$C > 4.10^{-11}$
PKC ε	-	$C > 4.10^{-11}$
PKC δ	-	$C > 4.10^{-4}$

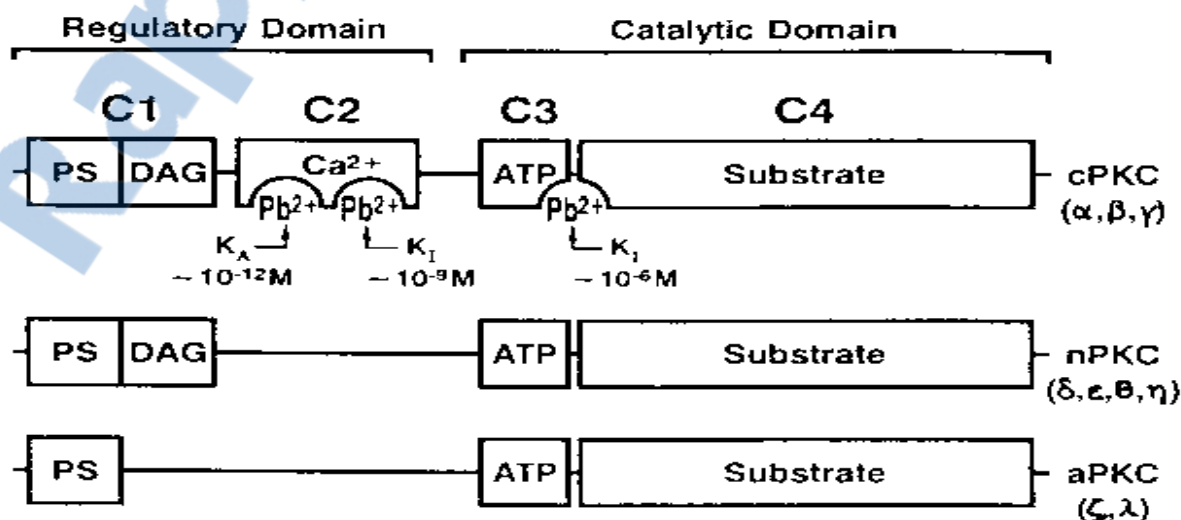
Ces observations *in vitro* montrent l'importance du domaine C2 pour l'activation des PKC par le plomb, puisque aucune des nPKC (δ et ε), qui ne possèdent pas ce domaine, ne sont activées par le plomb.

Source : A. Coppi et al. / *Annals NY Academy of Sciences* (1996) .

Ces données confirment la capacité du plomb à se substituer au calcium pour activer des PKC isolées. De plus, ils confirment l'importance du domaine C2 pour l'activation de PKC par le plomb puisqu'il n'y a pas d'activité observée chez les n-PKC. Enfin ces données indiquent que l'échelle de concentration du plomb nécessaire pour activer ou inhiber PKC est unique pour chacun des isoformes. Ceci suggère un schéma complexe d'activation ou d'inhibition des isoformes de PKC dans l'intoxication par le plomb à de faibles à moyennes expositions.

Ces effets variables de Pb^{2+} sur les différents isozymes de PKC sont compatibles avec l'existence d'interactions Pb-PKC multisites (Sun et al, 1999) (fig. 6).

Figure 6 : Modèle structural simplifié des sous-types de PKC illustrant les sites possibles d'interaction du plomb avec PKC.



Légende : Ce modèle (basé sur celui de Nishizuka, 1992) montre quatre régions conservées des cPKC, alignées ici pour plus de clarté.

On suppose ici que les cPKC contiennent trois sites de liaison à Pb^{2+} : des sites d'activation ($K_A \approx pM$) et d'inhibition ($K_I \approx nM$) dans le domaine C2 et un site d'inhibition ($K_I \approx \mu M$) dans le domaine catalytique. Si ce modèle est avéré, cela signifierait que Pb^{2+} ne peut être qu'inhibiteur pour les sous-types nPKC et aPKC.

Source : X. Sun et al./ Toxicology and Applied Pharmacology 156 (1999) 40-45.

Ainsi d'après ces auteurs, les interactions de Pb^{2+} avec le domaine C2 ont lieu à des concentrations de cation libre allant de 10^{-12} à 10^{-8} M, concentrations de l'ordre de celles obtenues lors d'expositions au plomb faibles à modérées.

L'existence de ces différentes isozymes et de leur différente sensibilité au plomb pourrait en partie expliquer l'évolution des effets du plomb sur LTP après une exposition pendant le développement. Ainsi une étude de Chen et al. (1999) nous apprend qu'une exposition chronique au plomb (G0 à PN56) diminue de manière significative le taux de PKC γ dans la fraction membranaire de l'hippocampe et du cortex frontal, alors qu'elle a peu d'effet sur PKC α , βII et ϵ . Or PKC γ , exprimée uniquement dans le cerveau et la moelle épinière est également le seul isozyme connu pour être impliqué dans les processus d'apprentissage. Cette action spécifique du plomb sur PKC γ est également rapportée par Reinholz et al. (1999) où une exposition chronique au plomb (G0 à PN1, 8, 15 ou 29) responsable d'une plombémie allant de 20 à 40 $\mu g/dl$, affecte à PN8 l'activité globale de PKC et la distribution subcellulaire de PKC γ .

Cette action différente du plomb selon l'âge sur l'activité de PKC et l'induction de LTP pourrait être une des raisons de la particulière vulnérabilité des systèmes nerveux en développement. Cependant, on retiendra principalement qu'**aux concentrations rencontrées du fait d'une exposition environnementale au plomb, le plomb a essentiellement un effet activateur sur PKC.**

C – Action du plomb sur les récepteurs NMDA

Les sites post synaptiques représentent pour le plomb une cible potentielle d'interférence avec la plasticité synaptique. Parmi eux les récepteurs NMDA, critiques pour l'induction de LTP dans l'aire CA1 et du gyrus denté.

De nombreuses études se sont tout d'abord focalisées sur les altérations de la fonction du récepteur NMDA induites par le plomb, mais il n'y a pas eu de consensus parmi les laboratoires quant à la nature de ces altérations. De plus, un effet inhibiteur direct du plomb sur le canal du récepteur NMDA ne semble pas avoir lieu au niveau d'exposition relevé dans l'environnement (Lasley et Gilbert, 1999), suggérant que les changements dans la fonction du récepteur NMDA sont assurés par d'autres mécanismes.

La plupart des études sur LTP ont utilisé une administration de plomb continue pendant le développement avec des tests réalisés sur des animaux adultes.

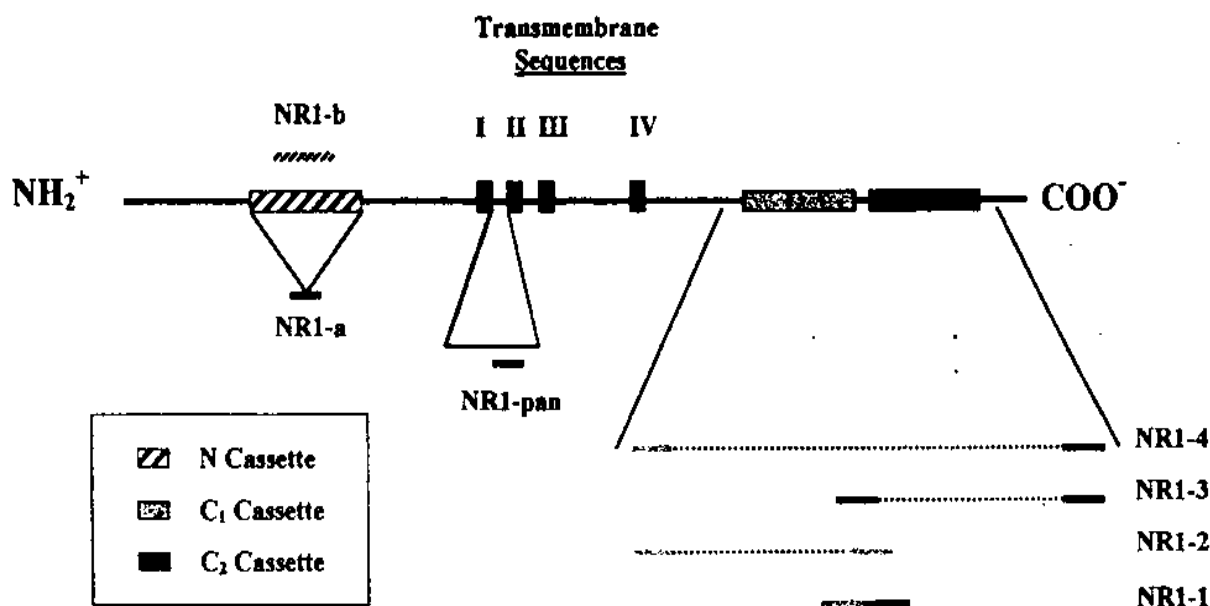
C'est pourquoi les investigations sur la fonction des récepteurs NMDA chez les animaux exposés qui sont volontiers comparés aux effets de l'exposition sur la plasticité synaptique suivent les mêmes protocoles, les prélèvements étant effectués sur des tissus provenant de rats adultes. Ma et al. (1997), après une exposition continue de rats depuis la conception jus

chacune étant exprimée à un moment et dans une région précise. Le gène NR1 (codant pour la sous-unité NMDA Récepteur 1) peut être épissé de différentes manières, produisant ainsi 8 variants. Quatre autres gènes codent pour les sous-unités NR2-A à D. Dans le cerveau, les récepteurs NMDA sont formés d'une ou plusieurs sous-unités NR1 combinées avec une sous-unité NR2-A et/ou B, chacun de ces assemblages ayant des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques distinctes.

Une étude de Guilarte et al. (1998) s'est penchée sur les effets d'une faible exposition au plomb depuis la gestation (plombémie de 20 à 40 µg/dl) sur l'expression dans le cerveau en développement des différentes sous-unités du récepteur NMDA. Dans le cerveau, les taux d'ARNm NR1 et NR2A sont les plus bas à la naissance, atteignent un pic vers 14-21 jours puis déclinent à partir de 28 jours. Les taux d'ARNm NR2B sont les plus élevés pendant le développement précoce puis déclinent avec l'âge. L'exposition au plomb a des effets significatifs et opposés sur l'expression des ARNm NR1 et NR2A, principalement dans l'hippocampe, alors qu'elle n'en a pas sur NR2B. Le taux d'ARNm NR1 est augmenté dans les cellules pyramidales de CA1 (15.3%) et CA4 (26.8%) à partir de PN14. A PN21, seul le taux d'ARNm NR1 reste significativement plus élevé (10.3%) dans CA4. Par contre l'exposition au plomb provoque une réduction des taux d'ARNm NR2A (11.9-19.3%) dans les couches de cellules pyramidales et granuleuses de l'hippocampe à PN14 et 21. Ceci est confirmé par une diminution du nombre de protéines NR2A, relevée par Nihei et Guilarte (1999). Le taux d'ARNm NR1 est également augmenté (14.0%) dans le cervelet à PND 28. Il n'y a pas de changements dans les taux d'ARNm des sous-unités dans les régions corticales et sous-corticales.

Ces chercheurs ont poussé plus loin leurs investigations en étudiant l'effet de l'exposition au plomb sur l'expression des 5 isoformes de NR1 les plus fréquemment rencontrés dans l'hippocampe (NR1-a, b, 1, 2, 4) dont la figure 7 propose une représentation schématisée (Guilarte et al., 2000).

Figure 7 : Présentation schématisée du gène de la sous-unité NR1.



Légende : Schéma complet du gène de la sous-unité NR1 montrant la position des sites utilisés par les marqueurs pour détecter les différents variants de la sous-unité NR1 dans le cerveau de rats par la méthode d'hybridation in situ.

Source : TR Guilarte et al./ Molecular Brain Research 76 (2000) 299-305.

Une exposition pendant le développement à des taux croissants de Pb^{2+} entraîne une augmentation des taux d'ARNm NR1-a dans les couches des cellules granuleuses et pyramidales de l'hippocampe à PN14. L'ARNm NR1-b est augmenté dans les cellules pyramidales à PN21. L'épissure des cassettes C-terminales est également modulée par cette exposition au plomb. L'ARNm NR1-2 est plus important dans les cellules pyramidales de CA4 et les cellules granuleuses dentées à PN21. L'expression de l'ARNm NR1-4 est accrue à PN14 et décline à PN21 dans les cellules pyramidales de CA3. On ne relève pas d'effets significatifs du plomb sur l'expression des ARNm NR1-1.

Ces données indiquent que l'épissure alternative du gène NR1 subit une régulation anatomique et temporelle par le plomb dans l'hippocampe en développement du rat.

Ceci pourrait avoir des conséquences sur la fonction du récepteur NMDA. Un schéma temporel des changements émerge dans l'expression des ARNm dans l'hippocampe des rats exposés au plomb, comme l'augmentation des taux d'ARNm NR1-a et NR1-4 à PN14 et des ARNm NR1-b et NR1-2 à PN21. De précédentes études ont indiqué que les récepteurs dont l'assemblage contient le variant NR1-a ont une affinité plus forte pour les agonistes et moins forte pour les antagonistes que ceux contenant NR1-b. L'exposition au plomb provoquant un changement significatif dans les populations d'ARNm des variants de NR1, les récepteurs NMDA alors exprimés dans les cellules pyramidales et granuleuses de l'hippocampe pourraient présenter des propriétés pharmacologiques différentes. Un point commun à PN14 et 21 entre les altérations induites par le plomb est l'expression accrue des ARNm des isoformes NR1-2 et NR1-4 ne possédant pas la cassette C-1, présentée dans la figure 7. Or cette cassette C-1 a été identifiée comme contenant les gènes codant pour un site de liaison de la calmoduline et un site de phosphorylation par PKC, modulant l'activité du récepteur. De plus, elle est impliquée dans les interactions avec des protéines de structure qui assurent un assemblage et un ciblage appropriés des récepteurs NMDA aux sites synaptiques, ainsi que la proximité d'importantes molécules de transduction de signal.

L'ensemble de ces résultats suggère que ces mécanismes régulateurs du récepteur NMDA supportés par la cassette C-1 soient altérés dans l'hippocampe des animaux exposés au plomb.

En plus de ces changements dans l'expression des ARNm des variants de la sous-unité NR1, ont également été décrits une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine NR2A dans l'hippocampe de rats exposés similairement au plomb, alors qu'aucun changement n'est observé concernant NR2B (Guilarte et McGlothlan, 1998). **Pris ensemble, ces faits suggèrent que l'expression dans l'hippocampe du récepteur composé de l'assemblage NR1/NR2A puisse être altérée par l'exposition au plomb.**

Ainsi, bien que toutes les études ne concordent pas sur ce point, **il semblerait qu'une exposition au plomb puisse augmenter la densité des récepteurs NMDA. De plus, le plomb modifierait l'évolution de la composition de l'assemblage des sous-unités constituant le récepteur NMDA, modifiant par là ses propriétés physiologiques et pharmacologiques.** Ces modifications dans le nombre, la distribution cellulaire et les propriétés des récepteurs NMDA pendant le développement pourraient aboutir à des altérations persistantes dans la connectivité et l'efficacité synaptique et être ainsi à la base du moindre apprentissage spatial et des déficits de LTP dans l'hippocampe observés chez les rats exposés au plomb.

L'évaluation des effets du plomb sur les mécanismes moléculaires sous-tendant la formation de la mémoire permet donc de constater qu'une exposition au plomb perturbe effectivement plusieurs molécules qui sont des piliers de la formation de la mémoire, pouvant par ce fait expliquer les déficits cognitifs rencontrés chez les enfants exposés. Cependant, le plomb n'affecte pas seulement la mémorisation, mais perturbe également le fonctionnement physiologique normal du système nerveux, altérant ainsi de nombreux autres processus liés aux neurones.

Troisième partie

**REVUE DES MECANISMES
D'ACTION POTENTIELS DU PLOMB
SUR LE FONCTIONNEMENT DU
SYSTEME NERVEUX CENTRAL**

Il est évident que les déficits comportementaux et neuropsychologiques rapportés suite à de faibles expositions périnatales au plomb reflètent des altérations du fonctionnement physiologique normal du système nerveux central.

Voici donc un passage en revue des différents effets significatifs du plomb aux faibles taux d'exposition rencontrés chez les enfants ($< 25 \mu\text{g/dl}$) sur l'organisation et le fonctionnement des neurones.

Sont tout d'abord présentés les effets morphologiques du plomb, évoquant les perturbations relevées dans la cytoarchitecture du cerveau, la synchronisation de la différenciation cellulaire et pouvant parfois conduire jusqu'à la mort cellulaire. Puis sont exposées les relations entre le plomb et les différents acteurs de la vie cellulaire, comprenant les neurotransmetteurs, les agents du métabolisme calcique, les protéines kinases et les facteurs de transcription, à la base de tous les effets de l'exposition précoce au plomb.

I – Interactions entre une exposition chronique au plomb pendant le développement et la morphologie du système nerveux central

1 – Altération par le plomb de la cytoarchitecture du cerveau

A – Revue des effets du plomb sur le développement morphologique des neurones

Ayant constaté les déficits cognitifs et comportementaux dus à une exposition précoce au plomb, les chercheurs ont voulu savoir s'ils reposaient sur des altérations morphologiques visibles des structures nerveuses. Ainsi des études *in vivo* ont montré que le plomb affectait subtilement la morphologie de l'hippocampe et du cortex de jeunes rats exposés pendant les périodes pré- et péri-natales. Dans l'hippocampe, les effets du plomb sur le système nerveux en développement incluent une réduction du développement de la « voie des fibres moussues » (Alfano et al., 1982*), des changements dans l'arborescence dendritique des cellules granuleuses (Petit et Alfano, 1982*) et une diminution de la densité des épines dendritiques des neurones pyramidaux (Kiraly et Jones, 1982*). Dans le cortex, Petit et Le Boutillier (1979*), Averill et Needleman (1988*) rapportèrent une diminution du nombre de synapses.

Cependant dans tous ces travaux, bien que les dosages n'aient pas été effectués, la plombémie était modérée à forte et ne correspond donc pas aux plombémies relevant d'exposition environnementale. Il semble que pour ces expositions, les cellules nerveuses affichent des réponses multimodales dépendant du type cellulaire, de la région du cerveau, de la durée, du moment et de l'intensité de l'exposition au plomb, ce qui explique la complexité des effets relevés.

Observant des neurones embryonnaires de l'hippocampe et du cortex en culture dans un milieu à 2 % de sérum fœtal de veau, exposés à des concentrations de plomb allant de 0.1 nM à 1000 μ M, Kern et Audesirk (1993) relèvent les effets du plomb sur plusieurs paramètres de croissance et de différenciation. Des faibles (10^{-9} à 10^{-6} M) et des fortes (10^{-3} M) concentrations de plomb inhibent l'initiation des neurites dans les deux types cellulaires. Seules de fortes concentrations de plomb (10^{-4} M) permettent d'observer un allongement supérieur des axones dans l'hippocampe, mais pas dans le cortex. Ces fortes concentrations induisent également une plus grande ramification des axones dans le cortex et l'hippocampe alors que cet effet est seulement observé dans le cortex à 10^{-8} M. Le plomb n'a pas d'effet sur le nombre de dendrites par corps cellulaire ni sur leur ramification.

Ces réponses semblent suggérer que différents mécanismes cellulaires sont à l'origine de la différenciation cellulaire, de la formation des neurites et de la ramification des axones, qui sont donc diversement affectés par le plomb.

L'effet inhibiteur du plomb sur le développement des neurites, principal effet observé aux concentrations qui nous intéressent, a été de nouveau étudié par Kern et Audesirk (1995) qui ont cherché à mettre en évidence le mécanisme cellulaire qui le sous-tend. L'initiation des neurites correspond à l'émergence d'un cône de croissance, et requiert des échanges complexes entre le cytosquelette, la membrane plasmique, la concentration intracellulaire de calcium et l'activité d'une ou plusieurs protéines kinases. La polymérisation et les interactions entre éléments du cytosquelette sont cruciales. Elles sont modulées par la phosphorylation par des protéines kinases (PKA, PKC, CaMKII), l'activité de celles-ci étant modulée directement ou non par le calcium et/ou le calcium et la calmoduline.

Il ressort de cette étude que le plomb à une concentration de 100 nM inhiberait l'initiation des neurites en stimulant de façon inappropriée la phosphorylation des protéines par PKA ou CaMKII.

Allant en partie à l'encontre de ces études menées sur des rats, une récente expérience sur des chatons faiblement exposés à partir de la naissance a mis en évidence une augmentation de la densité des épines dendritiques des cellules cérébelleuses de Purkinje (Patrick et Anderson, 2000). Les chats ayant une période de développement plus longue et une plus forte sensibilité à certains toxiques que les rats, les effets du plomb chez eux peuvent être considérés comme plus proches des effets dans l'espèce humaine. Ce modèle de changements morphologiques induits par le plomb chez des chatons présente ainsi une interprétation alternative des symptômes neurocomportementaux décrits chez les enfants exposés au plomb.

B – L'exposition précoce au plomb est à l'origine d'un déficit d'innervation cholinergique de l'hippocampe

L'innervation cholinergique extrinsèque de l'hippocampe provient presque exclusivement de la voie septohippocampale qui part du septum médian et de la bande verticale diagonale (MS/vDB) et a une terminaison dans quasiment toutes les sous-régions de l'hippocampe. Le rôle fondamental de cette voie nerveuse dans l'apprentissage et la mémoire a été prouvé par de nombreuses études qui ont montré

que des lésions du septum médian, l'administration d'antagonistes muscariniques ou l'immunolésion sélective des neurones cholinergiques septaux se traduisent par une diminution des performances aux tests d'apprentissage spatial ou de mémoire à court-terme.

Ces déficits rappelant les effets d'une exposition précoce au plomb, l'équipe de Suszkiw s'est à plusieurs reprises penchée sur l'étude de la « cholinotoxicité » du plomb chez des rats exposés depuis le seizième jour de gestation (G16) jusqu'à PN28 à 0.02% d'acétate de plomb (plombémie de 20 µg/dl). Ils constatèrent tout d'abord (Bielarczik et al., 1994) que cette exposition se traduisait par une diminution de 30 à 40% de l'activité de la choline acétyl transférase (ChAT), marqueur cholinergique, dans le septum et l'hippocampe de PN7 à PN28. Par contre, il n'y a aucune altération de l'activité de la glutamate décarboxylase, marqueur des neurones GABAergiques. Parallèlement à la diminution de l'activité de ChAT, la liaison de ligands spécifiques des récepteurs muscariniques M1 et M2 est diminuée de 30 à 40% dans le septum mais n'est pas altérée dans l'hippocampe.

Ces données indiquent une vulnérabilité préférentielle des neurones cholinergiques du septum au plomb, qui altère dans ces cellules l'expression des récepteurs muscariniques pendant une période critique (PN7 à PN28) de développement de la projection septohippocampale, pendant laquelle les synapses septohippocampales sont établies. L'absence d'effets sur les récepteurs muscariniques de l'hippocampe peut s'expliquer par la faible contribution de ces récepteurs pré synaptiques au nombre total de sites de liaison muscariniques dans l'hippocampe ou par une sur régulation des sites post synaptiques M2 suite à l'hypofonction cholinergique du septum.

Le degré de détérioration induit par le plomb dépend probablement de la nature de l'atteinte des cellules cholinergiques. Si le plomb agit comme une cholinotoxine interférant avec la neurogenèse des cellules cholinergiques dans le septum, une dégradation durable de la fonction cholinergique dans l'hippocampe peut en résulter, à moins que des mécanismes compensateurs ne se développent (ramification des axones, sur régulation des capacités de synthèse d'acétylcholine des neurones survivants et/ou sur régulation des récepteurs muscariniques post synaptiques). Si le plomb agit seulement en retardant la maturation fonctionnelle des cellules cholinergiques, bien que cela puisse porter atteinte à la formation et à la stabilisation des synapses pendant le développement, les conséquences comportementales en seraient affectées plus subtilement et éventuellement réversiblement.

Les chercheurs approfondirent ces résultats en 1995 (Tian et al.) où il s'avéra que cette exposition précoce au plomb entraîne une diminution de 30 à 40% de la liaison de l'hémicholinium-3 (HC-3) dans l'hippocampe de PN7 à PN28. Cette liaison reste encore diminuée de 40% par rapport aux contrôles un mois après la fin de l'exposition, à PN60. HC-3 est un ligand pour le système de récupération de l'acétylcholine (SDHACU) localisé aux terminaisons nerveuses cholinergiques. Pour savoir si cet effet correspond à une perte des cellules de projection cholinergique dans le MS/vDB, des comptages des cellules immunoréactives à la ChAT ont été effectués à PN21, qui apparurent réduits de 22%. Ces résultats suggèrent qu'une exposition périnatale au plomb génère une réduction durable de la densité des terminaisons nerveuses cholinergiques dans l'hippocampe, éventuellement imputable à une dégénérescence des neurones cholinergiques du septum se

projetant dans l'hippocampe. On ne peut cependant exclure que la réduction du nombre de cellules ChAT-immunopositives soit simplement le reflet d'une croissance et d'une arborisation altérées des axones cholinergiques pendant la période critique du développement postnatal, des réductions de croissance des neurites et du développement dendritique par le plomb ayant déjà été observées.

En prenant ces faits dans leur ensemble, que la conséquence ultime soit un défaut de croissance ou une mort cellulaire neuronale, les neurones de projection cholinergiques dans l'hippocampe issus de MS/vDB apparaissent spécifiquement vulnérables aux effets délétères d'une exposition au plomb pendant le développement. De plus, additionnée à la réduction d'activité de SDHACU démontrée par Silbergeld et Goldberg*, **la réduction du nombre de sites de liaison à HC-3 indique clairement que le plomb est responsable d'un déficit cholinergique fonctionnel significatif dans le système septo-hippocampal, ce qui est très probablement amené à avoir des effets négatifs sur le développement neurocomportemental et l'apprentissage.**

La persistance de ces effets a ensuite été explorée (Bourjeily et Suszkiw, 1997), l'exposition au plomb ne durant que de G16 à PN21. Une réduction de 30% de l'activité septale de ChAT et de 20% du nombre de cellules ChAT-immunoréactives dans le MS/vDB apparaît dès PN7, persiste deux mois après l'exposition (PN81) et est suivie d'un retour à une activité normale de ChAT, mais pas du nombre de cellules ChAT-immunoréactives, trois mois après l'exposition (PN112). Ces effets sont associés dans l'hippocampe à une réduction de l'activité de ChAT (30%), de la liaison HC-3 (40%) et du nombre de fibres AchE-positives (13 à 15 %). L'activité de ChAT et le nombre de fibres AchE-positives retournent à la normale vers PN112 et la liaison HC-3 vers PN200.

Ces résultats indiquent que **la réduction des marqueurs cholinergiques pré synaptiques de la voie septo-hippocampale suite à une exposition périnatale au plomb est associée à une perte de neurones cholinergiques issus de la projection septo-hippocampale** (neurones CSH) et donc d'une « dénervation » de l'hippocampe. Une restauration du nombre de fibres ChAT-immunopositives et de l'activité de ChAT a lieu vers le troisième mois post-exposition, sans recouvrement du nombre de cellules ChAT-immunoréactives, suggérant que cet effet est attribuable à une arborisation axonale et à une hyper-régulation de la synthèse de ChAT dans les neurones CSH qui ont survécu à l'agression par le plomb. L'absence de recouvrement parallèle de sites liant HC-3 indique que la restauration de la densité des fibres cholinergiques et de l'activité de ChAT ne s'accompagne pas de la formation concomitante de nouvelles connexions synaptiques dans l'hippocampe. Cependant ce taux de liaison HC-3 retourne à la normale six mois après l'exposition, indiquant soit la formation de nouvelles synapses, soit une hyper-régulation des sites de transport de la choline dans les synapses déjà présentes.

L'évolution de ces changements morphologiques et neurochimiques souligne le fait que **la première semaine de développement postnatal est une période de vulnérabilité des neurones CSH à la toxicité du plomb.** Les paramètres étudiés sont tous réduits le plus fortement vers PN7, indiquant que la cholinotoxicité du plomb est essentiellement maximale à ce moment, ce qui serait une explication à l'importance des déficits cognitifs suite à une exposition précoce.

Bien que la diminution de la ChAT-immunoréactivité dans le septum puisse refléter une réduction des taux de ChAT et /ou une mort cellulaire, cette dernière hypothèse est accréditée par le fait que le nombre de cellules ChAT-immunoréactives reste diminué jusqu'à PN112, alors que l'activité de ChAT était retournée à sa valeur d'origine. D'un autre côté, il faut noter que la réduction de 30% de l'activité de ChAT excède la perte neuronale qui est d'environ 20 %, signalant que la mort cellulaire ne peut être à l'origine que de 50 à 60 % du décremént observé de l'activité de ChAT. **Le plomb induit donc à la fois la mort cellulaire des neurones cholinergiques, et un dysfonctionnement à long-terme, quoique apparemment réversible, des neurones épargnés, peut-être en interférant avec l'expression des gènes cholinergiques.**

La perte induite par le plomb des cellules cholinergiques du MS/vDB s'accompagne d'une réduction de l'innervation cholinergique de l'hippocampe, comme le prouve le décompte des fibres AchE-positives dans l'hippocampe dorsal. Cet effet est cohérent avec la réduction persistante de la liaison de HC-3, qui donne une mesure de la densité des terminaisons cholinergiques dans l'hippocampe, et ne peut donc pas être simplement attribué à une réduction du taux d'AchE.

Le retour à la normale de l'activité de ChAT et de la densité des fibres prend trois mois, délai semblable à celui d'une ré-innervation de l'hippocampe après lésion chez l'adulte. Cela suggère que, comme dans ce cas, la « dénervation » induite par le plomb permette une arborisation collatérale compensatrice des afférents cholinergiques épargnés. Ceci est corroboré par le retour à la normale de la densité des fibres AchE-positives sans restauration du nombre de cellules ChAT-immunoréactives. Un aspect non négligeable de cette phase de ré-innervation post-exposition est l'absence de recouvrement parallèle de liaison de HC-3, alors que celui-ci est le reflet de l'innervation cholinergique fonctionnelle. Cependant cet effet n'est pas irréversible puisque la liaison de HC-3 redevient normale vers PN200. Malheureusement, on ignore si cela représente la formation de nouvelles synapses ou bien une compensation par une activité accrue des ChAT des synapses existantes. Cette distinction est importante car la nature des changements plastiques dans l'hippocampe peut déterminer la qualité de la restauration du comportement suite à l'agression par le plomb.

Toutes ces études indiquent qu'une brève exposition au plomb au cours des périodes critiques du développement provoque un déficit cholinergique durable dans l'hippocampe. La période de sensibilité maximale au plomb chez le rat en développement correspond approximativement au troisième trimestre de la grossesse chez l'Homme, suggérant que cette période de la vie fœtale est la plus vulnérable à la cholinotoxicité du plomb. Ces recherches ne résolvent pas le problème de la réversibilité fonctionnelle du déficit cholinergique induit par le plomb, bien que l'émergence de fibres cholinergiques compensatrices et le recouvrement éventuel des marqueurs cholinergiques pré synaptiques de l'hippocampe indiquent une possible restauration fonctionnelle.

C – L'exposition précoce au plomb est à l'origine de déficits neuroplastiques

Un autre facteur pouvant contribuer à l'altération par le plomb de la cytoarchitecture du cerveau est l'action du plomb sur les molécules d'adhésion cellulaire neuronales (NCAM). C'est une protéine qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines, qui est une des trois grandes familles de système de reconnaissance cellulaire. Les NCAM contiennent trois glycoprotéines de surface provenant du même gène, impliquées dans le contrôle des mouvements cellulaires et de la croissance des fibres en régulant la force de l'adhésion cellule-cellule. Ceci est permis par un mécanisme homophilique de liaison, dont la force est inversement proportionnelle au total des charges négatives, constituées par les acides sialiques associés aux hydrates de carbone.

En période périnatale, la chaîne carbonée des NCAM contient 15 à 20 résidus d'acide sialique, pour ne plus en contenir que 5 à 7 à PN15, comme chez l'adulte : il y a conversion d'une NCAM embryonnaire (-E) à une NCAM adulte (-A). Pendant la phase d'acquisition cellulaire (de PN0 à PN8), l'expression des NCAM-E augmente puis se stabilise pendant le positionnement cellulaire et l'élaboration des fibres (PN8 à PN12). Au moment correspondant à la stabilisation synaptique finale, le nombre des NCAM-E diminue rapidement pour être remplacé par des NCAM-A vers PN16. Ainsi pendant la synaptogénèse, la pauvreté en acides sialiques des NCAM augmente les interactions et la communication cellulaire et permet au final la consolidation de la structure neuronale. Au vu des effets du plomb sur le neurodéveloppement et la plasticité neuronale, il a paru opportun de s'intéresser aux effets d'une exposition périnatale du plomb sur les NCAM.

Ayant exposé des rats depuis la conception jusqu'à PN30 ou de la naissance jusqu'à PN30, Regan et Keegan (1990) notèrent qu'à partir de 20 µg/dl de plomb dans le sang, la conversion des NCAM-E en NCAM-A entre PN16 et PN20 n'avait pas lieu. **Ainsi, apparemment, l'exposition précoce au plomb retarderait la désialylation nécessaire à cette conversion des NCAM embryonnaires en NCAM adultes.** On suppose que cela serait le fait d'une stimulation de la golgi-sialyltransférase qui régule spécifiquement l'état de sialylation des NCAM. Chez les animaux adultes, cette exposition eut pour conséquences une capacité moindre à acquérir et surtout à consolider une réponse d'évitement passif.

Ce rôle des NCAM dans la stabilisation des synapses est également mis à profit pendant les périodes d'acquisition de l'information et de consolidation de la mémoire (Regan, 1993), ce qui explique qu'on ait également montré qu'elles interviennent dans le développement et la stabilisation de LTP (Luthi et al., 1994). Cette action passerait également par une modification de l'état de polysialylation des NCAM. La stabilisation des synapses produites transitoirement 6 à 8 heures après un test d'apprentissage dépendrait donc des NCAM (O'Malley et al., 1998). Et vers

En comparant des rats témoins à des rat exposés au plomb de PN1 à PN30 lors d'un test d'évitement passif réalisé à PN80, Murphy et Regan (1999) notèrent un déclin significatif de la réussite à ce test refait 5 jours après le premier entraînement. Les performances 48 heures après n'étaient, elles, pas affectées, suggérant un effet sur le stockage de la mémoire à long-terme. Poussant plus loin les investigations par une mesure des variations de l'état de polysialylation 10 à 12 heures après le premier test, il s'avéra que l'exposition au plomb, si elle n'affectait pas le nombre de base des neurones polysialylés du gyrus denté, retardait l'augmentation transitoire du nombre de ces neurones qui avait alors lieu 14 heures et non plus 12 heures après le test, et n'avait plus la même amplitude.

Ainsi une exposition au plomb pendant le développement résulterait en des déficits durables associés spécifiquement à la consolidation de la mémoire dans l'hippocampe, l'un de ces déficits pouvant être l'incapacité à activer pleinement la réponse de polysialylation des NCAM. Ces résultats peuvent être mis en relation avec d'autres, comme la nécessité de former des synapses pendant la phase de consolidation de la mémoire dans l'hippocampe (O'Malley et al.,1998) et comme l'association montrée entre un déficit de croissance synaptique et une diminution de la persistance de LTP suite à une exposition au plomb pendant le développement (Gilbert et Mack, 1998).

2 – En modulant l'expression de certains gènes clés, le plomb perturbe la synchronisation de la croissance et du développement cellulaire dans le cerveau

Le développement des cordons de glie dans le cerveau est critique pour la migration neuronale et l'élaboration synaptique qui en découle. Il est donc envisageable que l'altération par le plomb de l'élaboration synaptique puisse être attribuée à une différenciation précoce des cellules gliales ; c'est à dire que si un processus de croissance neuronale requiert la présence de cellules gliales, de telles interactions pourraient être compromises si l'un de ces types cellulaires se développait prématurément. Toute perturbation de la séquence de développement responsable de la migration neuronale, de la croissance dendritique et de l'élaboration synaptique pourrait résulter en une rupture permanente du réseau nerveux et des interactions cellulaires qui en dépendent. La réussite du développement du système nerveux repose sur des facteurs de signalisation et de synchronisation essentiels. Une altération de ces derniers pourrait conduire à l'échec des neurones et de la neuroglie à se différencier correctement. C'est pourquoi, au vu des effets morphologiques sur le système nerveux central d'une exposition au plomb pendant le développement, des études ont cherché à déterminer si cette exposition pouvait moduler l'expression de gènes associés spécifiquement au développement glial et neuronal.

A – Modulation par le plomb de l'expression de gènes impliqués dans le développement cérébral

Pour évaluer les effets du plomb, les chercheurs ont analysé les profils de développement des ARNm de gènes associés spécifiquement au développement neuronal et glial (Zawia et Harry, 1996). Ces gènes sont ceux de GAP-43 (growth associated protein-43), une protéine fortement présente dans les cônes de croissance neuronaux ; PLP (proteolipid protein) et MBP (myelin basis protein), constituantes structurales de la myéline du système nerveux central et exprimées seulement dans les oligodendrocytes différenciés ; GFAP (glial fibrillary acidic protein), protéine du cytosquelette et marqueur de la différenciation des astrocytes et l'actine, une protéine ubiquitaire, au développement régulé.

Le plomb n'apparaît pas perturber l'expression des gènes du cerveau de manière généralisée car le profil de développement du gène d'actine n'est pas significativement altéré par le plomb.

Concernant GFAP, Partl et al. (1998) ont cherché à mesurer, chez des rats de 17 à 21 jours, l'influence sur les taux d'ARNm de cette protéine d'une exposition à 750 ppm de plomb pendant la gestation et la lactation. Dans leur étude, les rats exposés, dont la plombémie est alors de 18 µg/dl, montrent une élévation du taux d'ARNm de GFAP dans les régions CA1 et CA2 de l'hippocampe, dans le striatum et dans le cervelet (pas d'effets dans CA3, le gyrus denté et le cortex). Cette étude est complétée par d'autres recherches où à une exposition de 750 ppm de plomb débutée après PN21 correspond une augmentation du taux d'ARNm de GFAP dans l'hippocampe de rats adultes, tandis qu'à la même exposition durant le développement précoce à l'exception de la troisième semaine correspond une diminution du taux d'ARNm de GFAP (Stoltenburg – Didingen et al., 1996).

Ces observations semblent souligner l'importance critique de la troisième semaine au cours de laquelle l'exposition au plomb est déterminante pour l'accroissement ou non de l'ARNm de GFAP. Cela viendrait du fait que l'accroissement transitoire normal de l'ARNm de GFAP au cours de cette troisième semaine refléterait une période transitionnelle de spécialisation de l'astrocyte. C'est approximativement vers PN15 que l'astrocyte acquiert la capacité à réagir par le processus morphologiquement reconnaissable d'astrogliose. **Ainsi en élevant le taux d'ARNm de GFAP, le plomb accélérerait la maturation de l'astrocyte**, ce qui éventuellement pourrait refléter la nécessité pour le système nerveux central de s'adapter et de se protéger vis à vis des taux croissants de plomb pendant le développement.

Pendant le processus d'élongation axonale, qui intervient lors du développement et de la régénération, GAP-43 est exprimée de façon maximale et est prédominante le long des axones qui s'allongent. Au fur et à mesure du développement, elle se concentre au sommet de l'axone en croissance, suggérant une participation importante à celle-ci. Les taux de GAP-43 relevés pendant la différenciation et la migration cellulaire sont très bas, pour augmenter ensuite de manière importante quand le processus d'élongation commence. Dans le cortex, ce phénomène débute lors du dernier stade embryonnaire et disparaît à la fin de la première semaine postnatale. Ce processus de croissance est suivi d'une forte et transitoire concentration de GAP-43 dans le neuropil, qui coïncide avec l'arborisation des axones et l'initiation de la synaptogénèse.

Schmitt et al. (1996) ont testé les effets d'une exposition au plomb pendant la gestation, la lactation, et la gestation et la lactation, sur le profil de développement de GAP-43, sur des rats de 6, 9, 12, 15 et 21 jours.

Dans le cortex, le fait le plus notable est l'absence complète pour les groupes lactation et gestation + lactation de pic d'ARNm GAP-43 à PN9, dont le taux reste jusqu'à PN25 significativement plus bas que pour le groupe témoin. Dans le groupe gestation, il existe un pic à PN9 comme chez le groupe témoin, mais le déclin est ensuite plus rapide et plus important.

Dans l'hippocampe, où le schéma normal de développement est le même que dans le cortex (pic à PN9 puis déclin jusqu'à PN25), la situation est sensiblement la même. Les groupes d'exposition postnatale et périnatale ont le même taux élevé d'ARNm à PN6 mais pas de pic à PN9. L'exposition limitée à la gestation provoque une élévation initiale d'ARNm à PN6 suivi d'un déclin à PN9 et 12.

Ces altérations du profil de développement de l'ARNm de GAP-43 par le plomb peuvent être associées à l'arrêt prématuré de la croissance axonale et à l'inhibition de la formation des synapses déjà décrites (Petit et al., 1983*). Des études plus récentes ont confirmé le rôle de cette protéine dans la potentialisation des réponses du cône de croissance à des signaux extérieurs. Le schéma normal d'arborisation dendritique est altéré par l'exposition précoce au plomb, avec une diminution de la longueur et du nombre de dendrites alors que l'arborisation à proximité du corps cellulaire est accrue (Petit et Alfang, 1982*). Cela pourrait résulter de l'altération par le plomb du processus de formation et de guidage des dendrites en raison d'une dépression de l'apparition et de la durée du cône de croissance axonale. Il en résulterait alors une altération de la connectivité du réseau neuronal à un moment où les échanges entre cellules nerveuses revêtent une très grande importance.

Le processus de myélinisation, stade final du développement neuronal, est caractérisé par une rapide accumulation de myéline durant les trois premières semaines, la myéline jouant par la suite un rôle crucial dans la conduction saltatoire du message nerveux. Du fait des fonctions et du développement interdépendants des cellules neuronales et gliales, certains événements intervenant pendant le développement peuvent influencer ce processus de myélinisation. C'est le cas par exemple d'une altération de la capacité des cellules oligodendrogiales à synthétiser la myéline ou bien d'une différence dans le nombre et la distribution des axones, qui pourraient influencer à la fois l'initiation de la myélinisation et la quantité de myéline synthétisée. Or chez des rats exposés à 0.2% de plomb pendant la lactation, Zawia et Harry (1995) ont relevé à PN20 d'importantes variations du taux d'ARNm dans le lobe frontal de deux composants structuraux de la myéline, soit **une très forte augmentation de PLP et une augmentation plus modérée de MBP**. Ainsi, bien que l'on ignore encore les conséquences de ces variations, **cette action spécifique du plomb sur les protéines structurales de la myéline pourrait influencer sur la composition de la myéline**. De plus, une autre étude (Zawia et al., 1998) prouve que l'exposition au plomb provoque un pic prématuré de PLP et MBP, qui a lieu à PN15 au lieu de PN25, soit pendant la période de différenciation neuronale et gliale. **Le plomb est donc responsable d'une différenciation cellulaire prématurée**. Ces deux événements pourraient avoir des répercussions sur le dialogue entre les cellules du cerveau ou sur leur fonctionnement.

Une exposition précoce au plomb semble donc perturber le schéma normal d'évolution des ARNm de GFAP, GAP-43, MBP et PLP, en accélérant l'apparition des pics de présence de ces ARNm, et par là peut-être en accélérant la maturation des processus qu'ils sous-tendent, et en diminuant l'amplitude de ces pics. Ces observations sont d'autant plus alarmantes qu'elles ont lieu à un moment où la synchronisation des processus de développement est primordiale.

Cette action du plomb sur les gènes spécifiques du développement du système nerveux central pourrait être attribuée à l'interaction du plomb avec des protéines régulant l'expression des gènes, et tout particulièrement avec les ZFP (zinc finger protein), facteurs de régulation transcriptionnelle contenant les domaines Cys2 His2 de liaison au zinc.

B – Altération par le plomb des mécanismes de liaison à l'ADN des ZFP

L'expression différentielle des gènes est caractéristique du développement et est due à un tableau complexe de régulations transcriptionnelles supportées par des facteurs spécifiques de liaison à l'ADN. Il existe plusieurs familles de facteurs de transcription structurellement différentes avec différents motifs de liaison, dont l'action est régulée au cours du développement et qui jouent des rôles critiques dans le développement du cerveau. Parmi ces facteurs, une attention particulière a été portée aux ZFP. En effet, les protéines contenant des acides aminés cystéine, hautement réactifs aux ions métalliques électrophiles, ont été proposées comme cibles premières des métaux lourds. Parmi ces protéines se trouvent les facteurs de régulation ZFP, ainsi nommés car la liaison du zinc aux domaines Cys2 His2 qu'elles

contiennent est responsable d'une conformation spatiale spécifique dite en doigt de gant, qui leur permet ainsi de se lier à l'ADN au niveau de sites particuliers, activant la transcription par les ARN polymérases.

Les premières études ont tout d'abord cherché à connaître quels étaient les effets du plomb sur la dynamique de la liaison entre ZFP et ADN dans des extraits de noyaux issus de cellules non exposées préalablement. Il est apparu (Hanas et al., 1999) que l'adjonction de plomb provoquait une inhibition rapide de la liaison ZFP-ADN, à des concentrations de l'ordre de 5 à 10 μM pour le facteur de transcription III A et de l'ordre de 500 μM pour Sp1, deux ZFP.

Les expériences qui suivirent visèrent à examiner la dynamique de la liaison ZFP-ADN dans des extraits de cellules en développement préalablement exposées à de faibles concentrations de plomb. Dans des extraits de noyau de cellules PC12, Zawia et al. (1998) ont observé un accroissement de la liaison Sp1-ADN 30 minutes après l'exposition, alors que le pic de liaison normalement présent à 48 heures disparaissait. Ces résultats suggèrent donc que l'exposition de cellules en développement au plomb puisse modifier l'activité de Sp1.

La maturation postnatale du cervelet suit un schéma de développement hautement synchronisé dans lequel les interactions entre neurones et glie sont critiques pour la croissance. En raison du nombre limité de sous-types de neurones qu'il contient et des solides connaissances sur son histogenèse, le cervelet représente un modèle idéal pour étudier les perturbations par les métaux lourds de la neurogenèse et de la gliogenèse. Le profil normal d'activité pendant le développement de Sp1 dans le cervelet suit le calendrier de la différenciation cellulaire, avec un fort pic d'activité de la seconde à la troisième semaine postnatale quand la différenciation neuronale et gliale est maximale. L'activité de Sp1 est la plus basse pendant la première semaine postnatale, période d'intense prolifération et division cellulaire des cellules granuleuses. **Dans les cervelets exposés, on observe un pic prématuré de liaison Sp1-ADN dans la première semaine postnatale.** Les profils d'ARNm des gènes de MBP et PLP montrent également des pics prématurés (cf. supra) or ces gènes sont connus pour contenir de multiples éléments reconnus par Sp1, dont on a par ailleurs rapporté qu'il jouait un rôle critique dans la différenciation des oligodendrocytes.

Appuyant ces résultats, les expériences de Reddy et Zawia (2000) ont évalué les effets d'une exposition précoce au plomb sur la liaison à l'ADN d'une autre ZFP, Egr-1 (early growth response-1), facteur de transcription fonctionnellement impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Les taux les plus hauts de liaison Egr-1-ADN surviennent vers PN15. Cela permet de supposer que Egr-1 a d'autres fonctions pendant la croissance du cerveau que la régulation de la croissance des neurites. D'ailleurs son profil d'évolution, très proche de celui de Sp1, serait compatible avec la différenciation gliale. **Chez les animaux exposés au plomb, des pics prématurés de liaison Egr-1-ADN apparaissent dans le cervelet.** Comme dans le cas de Sp1, la supplémentation des animaux en zinc (0.03%) a un effet protecteur sur les effets du plomb, et le plomb ne paraît pas agir via l'ARNm des ZFP. **Toutes ces similitudes suggèrent que pour ces deux ZFP le mécanisme d'action du plomb soit le même. Ce mécanisme commun pourrait dépendre d'une interaction directe du plomb avec la région sensible au zinc de ces protéines.**

Ces données permettent de conclure que les ZFP comme Sp1 et Egr-1 sont des cibles potentielles pour le plomb, et que l'exposition au plomb du cerveau en développement peut conduire à la perturbation de l'expression des gènes spécifiques du développement. De telles interactions peuvent aboutir à une différenciation cellulaire prématurée comme le prouve le schéma d'expression des gènes normalement exprimés dans les cellules en différenciation, et peut de ce fait altérer la synchronisation du développement cellulaire et de la croissance dans le cerveau. Bien que ces actions puissent être supportées par l'interaction entre le plomb et la région sensible au zinc de ces facteurs de transcription, cela n'exclut pas que d'autres mécanismes puissent être associés à cette modulation des liaisons ZFP-ADN. En effet, il a été montré que l'ajout de NGF (nerve growth factor) aux cellules PC12 en différenciation (cellules de phéochromocytome, considérées comme un excellent modèle pour l'étude de l'altération des processus chimiques engagés lors du développement et du fonctionnement des neurones) accélère l'induction de Sp1 et Egr-1. Ce processus passe par l'activation de ERK/MAPK (extracellular signal regulated protein kinase /mitogen activated protein kinase), composant clé de la régulation de la différenciation cellulaire et qui pourrait être lui-même aussi une cible pour le plomb.

C – Action synergique du plomb et de NGF sur la croissance des neurites via la potentialisation de l'activation de ERK/MAPK

Le rôle de NGF en tant que promoteur de la différenciation des cellules PC12 chez le rat est connu depuis une dizaine d'années. En se liant à son récepteur, il entraîne une cascade d'activations qui conduisent à l'activation de la MAPK kinase, activant elle-même directement ERK/MAPK, qui tient une place importante dans l'induction de la croissance des neurites.

Williams et al. (2000) ont prouvé que le plomb pouvait avoir un impact sur cette voie de la neuritogenèse dans les cellules PC12. Pour cela, ils ont exposé ces cellules à des concentrations croissantes de plomb (0.1, 1 et 100 μ M) en présence ou non de NGF et ont constaté que si NGF augmente de 37% la formation des neurites par rapport aux cellules non traitées, l'addition supplémentaire de plomb résulte en une augmentation de 56.6, 57 et 61.7% de formation des neurites. Par contre, le plomb sans NGF n'a aucun effet. Le plomb potentialise donc la neuritogenèse pour les cellules traitées au NGF. De plus, il favorise l'apparition de plus de deux extensions par cellule, bien qu'il n'ait pas d'influence sur la longueur de celles-ci. Ces effets passent par une potentialisation par le plomb de l'activation de ERK/MAPK par NGF. Or la conséquence de l'activation de ERK/MAPK est sa translocation dans le noyau où elle active des facteurs de transcription. Cette interaction du plomb avec la voie de ERK/MAPK pourrait donc conduire à une modulation de l'activité transcriptionnelle. Les relations entre plomb et facteurs de transcription ont d'ailleurs déjà été démontrées, qu'il s'agisse du facteur c-fos (Kim et al., 1997) ou de la stimulation prématurée de Egr-1 et de Sp1 (Zawia et al., 2000 et 1998). **Ainsi le fait que le plomb agisse en synergie avec NGF pour stimuler l'activation de ERK/MAPK, ajouté aux résultats précédents, suggère fortement un rôle central du plomb dans l'altération de l'expression des gènes.**

3 – Cytotoxicité du plomb

On l'a vu, l'exposition chronique au plomb est hautement neurotoxique, affectant tout particulièrement le système nerveux central en développement. Il est affecté chez les enfants par des plombémies aussi faibles que 1.3 à 13 μM (= 2.7 à 27 $\mu\text{g/dl}$), entraînant des déficits cognitifs durables. Des rats exposés précocement au plomb montrent des changements dans le développement cytoarchitectural de l'hippocampe et du cortex, une réduction du nombre et du diamètre des axones du nerf optique et une démyélinisation des nerfs périphériques (Rodier, 1995). Parmi tous les mécanismes proposés pour expliquer comment le plomb peut altérer ainsi la fonction neuronale, certains chercheurs ont suggéré que l'influence du plomb sur la différenciation, la survie et la croissance des neurones soit indirectement liée à la cytotoxicité de ce métal lourd.

Deux mécanismes permettent aux agents neurotoxiques de provoquer la mort cellulaire dans le cerveau en développement :

- La nécrose, forme de mort cellulaire pouvant être initiée par une stimulation excessive et prolongée des récepteurs spécifiques au glutamate.
- L'apoptose, forme de mort cellulaire survenant notamment pendant le développement, accompagnée de cassures actives de l'ADN, nécessitant l'activation de gènes spécifiques, et bloquée *in vitro* par des inhibiteurs des synthèses protéiques.

Il paraît donc opportun d'évaluer si réellement le plomb peut promouvoir ces mécanismes de mort cellulaire et de quelle façon.

A – Mécanismes d'action du plomb pouvant expliquer sa cytotoxicité

Le glutamate joue un rôle crucial dans le cerveau où il est le plus abondant des neurotransmetteurs. Par sa liaison aux récepteurs ionotropiques et métabotropiques, il contribue à l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) par un afflux du calcium extracellulaire ou par une libération du calcium stocké dans la cellule. C'est pour cette raison que le glutamate à forte dose peut également être toxique pour les neurones, en augmentant de manière inconsidérée la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cela se traduit par des altérations du cytosquelette, la libération d'acides aminés excitateurs, la moindre récupération de ces acides aminés et la production de radicaux libres.

Un des effets du plomb qui pourrait être à la base de sa toxicité neuronale est donc son action sur la glutamine synthétase des astrocytes en développement (Engle et Volpe, 1990). En effet, il semblerait que de faibles doses de plomb (2.5 μM) appliquées à des cultures de cellules gliales primaires enrichies à 95 % en astrocytes en différenciation, résultent en une inhibition de 70% de l'activité de la glutamine synthétase, qui permet de transformer le glutamate en glutamine non toxique. Cette inhibition serait due à une liaison du plomb avec les groupements sulfhydryles de l'enzyme. Si cette accumulation de glutamate n'est pas ou peu préjudiciable pour les astrocytes, elle risque cependant en perturbant ainsi l'une de leur principale fonction

de détoxification de porter atteinte aux neurones, sensibles à une augmentation du taux de glutamate extracellulaire.

Les relations entre plomb et astrocytes revêtent par ailleurs une importance considérable du fait du rôle de ces cellules dans la détoxification du cerveau, due à leur capacité à stocker les métaux. Cette capacité à séquestrer le plomb n'est cependant véritablement effective qu'après la maturation des tissus cérébraux, ce qui pose le problème de la toxicité du plomb envers les neurones lors d'exposition précoce. De plus, **une fois capturé par les astrocytes, le plomb peut être à l'origine de dommages métaboliques, en altérant l'activité enzymatique comme décrit précédemment pour la glutamine synthétase, mais aussi en interférant avec l'ATPase transportant le cuivre** (Tiffany-Castiglioni et Quian, 2001). Cette enzyme permet aux astrocytes de transférer aux neurones le cuivre transporté dans le sang. Or le cuivre est un nutriment cellulaire essentiel et l'arrêt de son transfert aux neurones cause la mort de ces derniers.

Le plomb a également été décrit comme interférant avec de nombreux processus cellulaires calcium-dépendants, que ce soit en mimant l'action du calcium ou bien en modulant les flux de calcium (Simons, 1993). C'est pourquoi la question s'est posée de savoir si le plomb pouvait être à l'origine de stress oxydatif, et si oui, comment il interagissait avec le glutamate.

Loikkanen et al. (1998) ont donc étudié les effets du plomb et du glutamate sur des cellules hypothalamiques murines GT1-7, et Naarala et al. (1995) sur des cellules de neuroblastomes humaines SH-SY5Y, qui diffèrent des précédentes par une expression plus importante du gène antiapoptotique bcl2, protecteur du stress oxydatif. Dans GT1-7, le glutamate augmente la production de radicaux libres, en présence ou non de calcium extracellulaire, sans faire appel à PKC. Cet effet passerait par l'accroissement de la $[Ca^{2+}]_i$, issu du milieu extracellulaire ou des stocks intracellulaires. Dans SH-SY5Y, le glutamate peut augmenter la production de radicaux libres après déplétion de la glutathion peroxydase (GSH) par une voie impliquant PKC. Dans les deux cas, cela ne porte pas atteinte à la viabilité cellulaire.

Si le plomb à lui seul n'a pas lui non plus d'effets majeurs sur la viabilité de ces deux cellules et ne peut induire la synthèse de radicaux libres, son association ($Pb = 1mM$) avec du glutamate altère significativement la viabilité cellulaire. La présence conjointe du plomb et du glutamate amplifie fortement la production de radicaux libres, mais seulement en l'absence de calcium extracellulaire, et apparemment en modifiant l'activité de PKC. Par ailleurs, alors que la réduction du stock intracellulaire de GSH par le glutamate était due à la formation de radicaux libres, il apparaît que lors de présence conjointe de plomb et de glutamate, la réduction du taux de GSH et la cytotoxicité qui s'ensuit ne passent pas seulement par la synthèse de radicaux libres. En effet, le taux de GSH et la viabilité cellulaire sont altérés de la même manière qu'il y ait ou non du calcium extracellulaire, ou un inhibiteur de PKC.

Ces recherches ont été affinées par Jadhav et al (2000), qui ont comparé sur des cellules PC12 les effets d'une exposition à faible dose au plomb (0.01 à $10 \mu M$), semblable à celle rencontrée chez les enfants, sur la $[Ca^{2+}]_i$, l'activité de PKC et les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire. Ils constatèrent, contrairement à Loikkanen (1998), que le plomb en l'absence de glutamate est responsable de la production de radicaux libres de manière dose-dépendante, corrélée à l'augmentation de la cytotoxicité. Cela est amplifié par l'ajout de $500 \mu M$ de

glutamate. Cette mort cellulaire est partiellement bloquée par l'ajout de staurosporine (inhibiteur de PKC) et de MK-801 (antagoniste des récepteurs NMDA). Par ailleurs, ils notèrent que dans un milieu extracellulaire normal, les faibles concentrations de plomb ($0.01 \mu\text{M}$) augmentaient l'activité de PKC et la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via les récepteurs NMDA et les canaux calcium voltage-dépendants, alors que les concentrations plus fortes de plomb ($10\mu\text{M}$) diminuaient l'activité de PKC et ne modifiaient pas le taux de calcium. **Ils en conclurent donc que dans la cytotoxicité induite par le plomb, la modulation de PKC et du calcium intracellulaire tient une place importante dans l'augmentation de la formation des radicaux libres générés par le glutamate, et donc dans la mort cellulaire qui en découle.**

B – Conséquences de ces modifications induites par le plomb sur les cellules neuronales et gliales

Les effets du plomb évoqués ci-dessus, comme l'augmentation de la concentration intracellulaire de glutamate et la production de radicaux libres peuvent conduire à la nécrose des cellules concernées.

L'action du plomb sur le glutamate est tout particulièrement ressentie par les astrocytes, puisque ce sont ces cellules gliales qui monitorent la concentration extracellulaire de glutamate en la maintenant à un très faible niveau (1 à $3 \mu\text{M}$) afin d'assurer un très faible bruit de fond à la neurotransmission glutamatergique et d'éviter l'action toxique du glutamate sur les neurones. Pour cela, le glutamate est transporté dans l'astrocyte puis dégradé en glutamine. C'est pourquoi le plomb, en inhibant la glutamine synthétase et en stimulant le largage pré synaptique de glutamate, peut être à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de glutamate, ce qui se traduit par un gonflement de l'astrocyte. Bien que ce mécanisme ne soit pas toujours suivi de nécrose, il entraîne cependant des perturbations de l'équilibre osmotique extracellulaire et donc perturbe la fonction neuronale (Hansson et al., 2000).

La production de radicaux libres en grande quantité peut, quant à elle, induire la nécrose des cellules neuronales et gliales par peroxydation des lipides. En effet, le taux de peroxydation des lipides est corrélé à l'importance de l'exposition au plomb (Sandhir et al., 1994).

Le plomb ne subissant pas de cycle oxydo-réducteur, cette peroxydation est due indirectement à son effet sur GSH et les autres enzymes antioxydantes, attribué à la forte affinité du plomb pour les groupements sulfhydryles et les cofacteurs métalliques présents dans ces enzymes. Le plomb agit également en perturbant les fonctions mitochondriales par l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, le tout contribuant à stimuler la synthèse des radicaux libres générés par le glutamate. La peroxydation des lipides qui s'ensuit provoque la cassure des chaînes d'acides gras poly insaturés et donc la fin de la perméabilité sélective de la membrane, d'où le gonflement des cellules neuronales et gliales et leur nécrose (Aschner et al., 1999).

Toutefois ces événements n'ont lieu que dans le cadre d'exposition relativement conséquente au plomb, et les chercheurs s'accordent plutôt pour penser que la cytotoxicité du plomb repose davantage sur le phénomène d'apoptose.

Une des raisons pour attribuer la cytotoxicité du plomb à l'apoptose est que de nombreuses études ont conclu que le plomb, seul ou combiné au glutamate, était responsable de la liaison de certains facteurs de transcription à l'ADN et d'altérations dans l'expression de nombreux gènes. C'est le cas par exemple pour c-fos (Kim et al., 1997) et pour Ap1 et pour NF- κ B, régulés par oxydo-réduction, dont l'altération de la liaison à l'ADN est probablement due à la production des radicaux libres (Savolainen et al., 1998).

Par ailleurs, Ramesh et al (2001) ont récemment démontré qu'une exposition à 50 ppm de plomb administré via l'eau de boisson activait les caspases du cerveau, à priori par l'action pro-oxidante du plomb, or les caspases sont des médiateurs de l'apoptose. Ils ont eux aussi conclu à l'activation de NF- κ B par les radicaux libres générés par le plomb, rappelant que ce facteur de transcription est considéré comme impliqué dans le processus d'apoptose (bien que les études divergent quant à savoir s'il bloque ou active l'apoptose, ce dernier effet étant le plus communément admis).

Cependant, Loikkanen (1998), notant que le glutamate seul n'était pas toxique, en conclut que la cytotoxicité jointe du glutamate et du plomb était principalement due au plomb et passait préférentiellement par des mécanismes autres que la production des radicaux libres. D'autres études vont également dans ce sens (Bondy et Lebel, 1993 ; Moreira et al, 2001).

Parmi ces autres mécanismes menant à l'apoptose, on retient l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Oberto et al. (1996) prouvèrent que le plomb à des concentrations micro molaires pouvait induire la mort de cellules granuleuses cérébelleuses de rats via l'apoptose. Cet effet est prévenu par un antagoniste des canaux calcium, suggérant le rôle déterminant de l'afflux de calcium. Cette conclusion est corroborée par He et al. (2000) qui observèrent que dans la rétine, le plomb conduit à l'apoptose sélective des bâtonnets via une surcharge en calcium, plomb et calcium provoquant l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, ce qui initie la cascade des caspases du cytochrome-c et mène à l'apoptose.

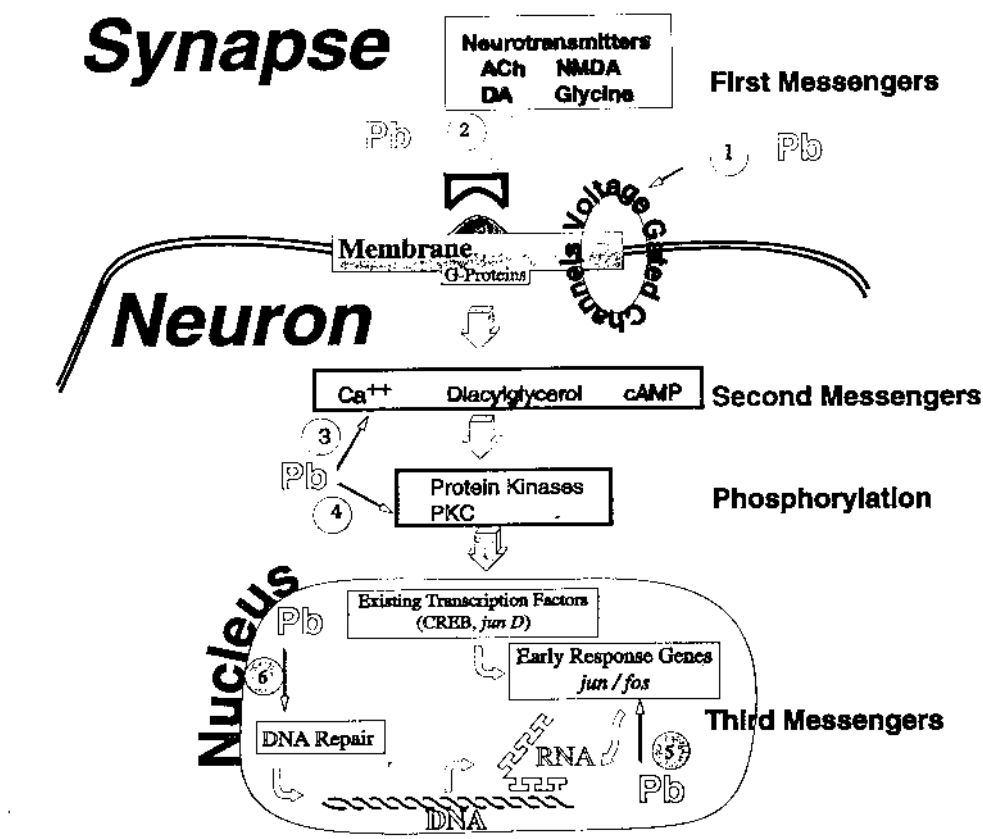
Conduisant également à l'apoptose, la fragmentation de l'ADN : le plomb, seul ou combiné au glutamate (mais pas le glutamate seul), pourrait induire la fragmentation de l'ADN dans les cellules SH-SY5Y (Naarala et al., non publié) ou dans les cellules GT1-7 (Loikkanen et al, 1998).

Les données ne manquent pas, sur l'action combinée du plomb et du glutamate ou du plomb seul, qui concluent à la production de radicaux libres et à l'induction d'un stress oxydatif dans les différentes lignées cellulaires du cerveau. Ces événements semblent être associés à un accroissement de la mortalité cellulaire, que ce soit par un processus apoptotique ou nécrotique. Cette cytotoxicité semble corrélée à l'importance de l'exposition au plomb. Il paraît très probable que ce soit une action sur les facteurs de transcription et une altération de l'expression des gènes qui soient les derniers maillons impliqués dans la mort cellulaire par apoptose ou nécrose induite par le plomb. D'autres actions du plomb, comme l'augmentation intracellulaire de glutamate dans les astrocytes ou l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules nerveuses pourraient être des causes majeures de cytotoxicité.

II – Le plomb perturbe la biologie des cellules nerveuses par ses actions sur les systèmes de communication cellulaire

La neurotoxicité du plomb pourrait prendre sa source dans la multitude des mécanismes intracellulaires qui, à différents niveaux, supportent la communication cellulaire et intracellulaire : les systèmes des premiers, seconds et troisièmes messagers. Ces différents effets, développés et détaillés par la suite, sont résumés de manière synthétique par la figure 8.

Figure 8 : Sites d'action présumés du plomb dans les neurones.



Légende : Présentation des différents points d'interaction du plomb avec les mécanismes cellulaires des neurones :

- (1) canaux voltage-dépendants.
- (2) Neurotransmetteurs (système des premiers messagers).
- (3) Seconds messagers.
- (4) Protéines kinases.
- (5) Système des troisièmes messagers.
- (6) Réparation de l'ADN.

Source : Y. Finkelstein et al./ *Brain Research Reviews* 27 (1998) 168-176.

1 – Perturbations par le plomb des systèmes des neurotransmetteurs

A – Plomb et système cholinergique

Comme cela a déjà été rapporté (cf. 3^{ème} partie-I-1-B), une courte exposition périnatale au plomb suffit à diminuer de façon sensible et durable le taux de marqueurs cholinergiques pré synaptiques dans le septum et l'hippocampe. Bien que le mécanisme sous-tendant cette cholinotoxicité ne soit pas encore connu, des indices croissants suggèrent que le plomb altère le système cholinergique septo-hippocampal en induisant la mort cellulaire des neurones cholinergiques et en interrompant la régulation au cours du développement de l'expression des gènes cholinergiques.

Appuyant cette hypothèse, l'expérience de Sun et al. (1997) a comparé les effets d'une exposition périnatale au plomb sur le schéma de développement de l'ARNm de l'acétylcholine transférase (ChAT) et de l'activité de ChAT dans le septum entre PN7 et PN21. Les résultats indiquent une importante réduction des taux d'ARNm ChAT (69, 47 et 47%) et de l'activité de ChAT (50, 33 et 22%) à PN7, 14 et 21, respectivement, alors que cette exposition n'a aucun effet sur les taux d'ARNm des mères. Des résultats similaires sont rapportés concernant l'action du plomb sur l'expression de l'ARNm du transporteur vésiculaire de ACh (VACHT) (Sun et al., 1997).

Ces observations suggèrent que le plomb compromet la transcription du gène ChAT et VACHT et /ou altère la stabilité de leur ARNm d'une façon dépendant du stade de développement. On constate également que le plomb cause une plus forte réduction du taux d'ARNm ChAT que de l'activité de ChAT. Il existe donc un excès de transcrits ChAT par rapport au nombre d'enzymes actives, ce qui suggère une régulation translationnelle ou post translationnelle de l'expression de ChAT dans les neurones septaux. Un corollaire serait que le plomb affecte la transcription, mais a peu ou pas d'effets sur les mécanismes de régulation translationnelle ou post

translationnelle. **Le plomb est donc responsable à la fois d'une perte de neurones cholinergiques septaux et d'une réduction de l'expression des gènes ChAT et VACHT.**

Cette perturbation de l'expression des gènes a été confirmée par des études *in vitro* sur PC12 (Tian et al., 2000), où le plomb affecte l'activité et le taux d'ARNm de ChAT de manière biphasique, les réduisant vers 0.5 μ M, cet effet s'atténuant à de plus fortes concentrations. Cet effet ne serait pas lié à l'activation de PKC.

Toutes ces observations prouvent que le plomb est à l'origine d'une hypofonction cholinergique dans le septum. Celle-ci serait compensée par une sensibilité accrue des récepteurs muscariniques M2 pré synaptiques (et éventuellement pient1763taliprouvent22ARNm

Le récepteur NMDA n'est pas le seul récepteur au glutamate touché par le plomb. En effet, il semblerait que **pour l'exécution de certaines tâches**, comme pour celle qui consiste à apprendre à un rat à ne pas descendre d'une plate-forme, **c'est par son action sur le récepteur AMPA que le plomb diminue les performances** (Chen et al. , 2001). En soumettant à ce test des rats exposés à 0.2% d'acétate de plomb à différentes périodes du développement (GL, WL, GW), ils constatèrent que tous les groupes présentaient une diminution des performances et de la liaison au récepteur AMPA dans le cortex et l'hippocampe, alors que seuls les rats exposés en continu depuis la conception (GL) montraient une augmentation de la liaison de MK-801 au récepteur NMDA. C'est donc l'action sur le récepteur AMPA qui paraît la plus corrélée aux diminutions de performances. Il s'agit là d'un déficit de la phase d'acquisition et non de rétention de l'information, qui pourrait provenir, du fait des altérations des propriétés des récepteurs AMPA, d'un changement dans la plasticité synaptique impliquée dans l'acquisition de cette tâche.

Ainsi donc, les effets du plomb sur le système glutamatergique pourraient contribuer à expliquer ses effets négatifs sur l'apprentissage et la mémoire.

C – Plomb et système dopaminergique

L'implication du plomb dans la perturbation du système dopaminergique a été mise en évidence lors de test de réponses à intervalle fixe (appelé schéma FI). Le schéma FI récompense et donc renforce un comportement qui a lieu après qu'un délai fixé soit écoulé. Toutes les espèces testées réagissent par une période d'inertie au début de l'intervalle, suivie par une augmentation croissante du taux de réponses au fur et à mesure que le moment de la récompense approche. Ce test, réalisé chez les primates et les rats soumis à de faibles expositions au plomb, quelle que soit la période d'exposition, résulte en une élévation du taux de réponses et produit des schémas de réponses atypiques. De nombreux faits sont en faveur d'une participation du système dopaminergique à ce test, et plus précisément, du système dopaminergique mésolimbique du *nucleus accumbens*.

Mais les opinions divergent quant à l'effet du plomb sur la bio-disponibilité de la dopamine.

L'hypothèse selon laquelle l'exposition au plomb provoquerait un excès de dopamine suivie d'une hyporégulation des récepteurs dopaminergiques post synaptiques est notamment soutenue par l'équipe de Cory-Slechta. Elle montra qu'une exposition après le sevrage à 50 et 150 ppm d'acétate de plomb (plombémie de 15 µg/dl) résulte en une augmentation importante du taux de dopamine libérée suite à l'injection de KCl (Zuch et al., 1998). Et inversement, l'injection dans le *nucleus accumbens* d'agoniste de la dopamine augmente le taux de réponses au schéma FI de la même manière que le plomb (Cory-Slechta et al., 1998). Allant dans ce sens, les expériences de Ramin et Porter (1997) et de Tian et al. (2000) montrent que le plomb, à 10^{-3} M, augmente la sécrétion des catécholamines et l'activité et les taux d'ARNm de la tyrosine hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse des catécholamines, dans les cellules PC12.

D'un autre côté, beaucoup de témoignages sont en faveur d'une action inhibitrice du plomb sur la bio disponibilité de la dopamine. La même exposition post sevrage de 50 et 150 ppm de plomb que lors de l'expérience de Zuch et al. résulte, pour Kala et Jadhav (1995), d'une diminution des taux de base de dopamine et de ses métabolites ainsi que du taux de dopamine libérée par K^+ dans le *nucleus accumbens*. Aréola et Jadhav (2001), qui avaient déjà montré que le plomb diminuait également l'activité de la tyrosine hydroxylase dans le *nucleus accumbens*, constate qu'une exposition post sevrage à 50 ppm module les effets des agents spécifiques du récepteur D2 sur le schéma FI, en augmentant la sensibilité aux agonistes et en diminuant les effets des antagonistes de la dopamine. Les chercheurs avancent l'hypothèse d'une régulation par le plomb de la synthèse et de la libération des auto-récepteurs, qui diminueraient l'activation de la tyrosine hydroxylase d'où une diminution de synthèse des catécholamines.

Ces conclusions différentes pourraient résulter de différences dans le taux, la durée et le moment de l'exposition au plomb. Les récepteurs dopaminergiques sont par exemple connus pour s'adapter à une administration chronique d'agonistes ou d'antagonistes dopaminergiques. S'ajoutant à ces différences de protocoles, ces résultats contradictoires pourraient également être le fait de dérégulation par le plomb des autres neurotransmetteurs, l'aire tégumentale ventrale dont sont originaires les corps cellulaires dopaminergiques du *nucleus accumbens* recevant des informations glutamatergiques, nicotiniques et GABAergiques.

Toutes les études s'accordent cependant sur l'importance spécifique du *nucleus accumbens* dans la modulation par le plomb du système dopaminergique. Zuch et al. (1998) montrent la vulnérabilité au plomb du *nucleus accumbens* par rapport au striatum, et Kala et Jadhav relèvent qu'une exposition à 25 et 50 ppm de plomb pendant 80 jours n'affecte le taux de dopamine que dans le *nucleus accumbens* (pas dans le cortex frontal, l'hippocampe, le tronc cérébral et le striatum). Ce fait est particulièrement intéressant, car si le système dopaminergique du *nucleus accumbens* n'intervient pas dans l'apprentissage, il est clairement impliqué dans les comportements motivés. Passant en revue toutes les études à ce sujet, Ikemoto et Pank (1999) concluent que le système dopaminergique du *nucleus accumbens* joue un rôle central dans les intégrations sensori-motrices, qui sont facilitées par des réponses d'approche flexible qui permettent donc une meilleure adaptation au monde extérieur.

2 – Interférences du plomb avec le système des seconds messagers par la remise en cause du métabolisme du calcium

L'altération par le plomb de l'homéostasie calcique des neurones est l'élément central de la neurotoxicité du plomb, car elle lui permet non seulement d'interférer avec la libération et la re-capture des neurotransmetteurs mais aussi car le plomb perturbe de cette façon le rôle de second messenger du calcium, à l'origine de la modulation de l'activation des protéines kinases qui assurent la transmission et l'amplification des messages dans le milieu intracellulaire.

A – Les multiples facettes des relations plomb-calcium

Depuis de nombreuses années, l'hypothèse selon laquelle la toxicité du plomb reposerait sur la perturbation des mécanismes calcium-dépendants a été avancée. La concentration cytoplasmique de calcium est relativement basse (100 nM) du fait de l'extrusion du calcium par les pompes à calcium et de la séquestration du calcium dans les organites intracellulaires. Une excitation chimique ou électrique des cellules provoque une augmentation de cette concentration de calcium à l'origine de nombreux événements cellulaires comme la libération des neurotransmetteurs ou l'activation d'enzymes. Or il a été prouvé que le plomb interagissait avec le calcium à différents niveaux et interférait ainsi avec sa fonction de messenger intracellulaire.

Le plomb est tout d'abord responsable d'une modification des flux de calcium et de l'homéostasie calcique. Cependant, bien que ces phénomènes soient observés depuis longtemps, leur étude est rendue difficile par le fait que les effets du plomb varient selon sa concentration. L'exposition de cellules PC12 à 10^{-8} M de plomb augmente la concentration intracellulaire de calcium, tandis qu'une exposition à 10^{-5} M la diminue (Jadhav et al, 2000). L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ par le plomb est empêchée lorsque l'on bloque les canaux calcium voltage-dépendants et les récepteurs NMDA. De fait, l'effet puissamment inhibiteur du plomb sur les canaux calcium voltage-dépendants souvent rapporté n'existe que pour de fortes concentrations de plomb (10^{-5} M), inenvisageables dans le cas d'exposition chronique (Simons, 1993). Les mécanismes permettant cette **augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ aux concentrations de plomb qui nous préoccupent** n'ont pas encore été pleinement mis à jour.

Mais les effets du plomb sur le système de transduction de signal ne reposent pas uniquement sur cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. En effet, les ions Pb^{2+} , du fait de leur similitude avec les ions Ca^{2+} à la fois en charge et en taille, peuvent se substituer au calcium dans les processus calcium-dépendants, notamment par leur liaison aux kinases et phosphatases calcium-dépendantes, pour lesquelles il a même parfois plus d'affinité que le calcium. Parmi ces protéines, la calmoduline et la PKC, d'où des altérations conséquentes du système des seconds messagers.

B – Modulations par le plomb du métabolisme de l'AMPC

Etant donné les similitudes entre Ca^{2+} et Pb^{2+} , il n'est pas étonnant que le plomb puisse se substituer au calcium en tant que second messenger. Un des meilleurs exemples à ce sujet est la capacité du plomb à lier et activer la calmoduline. La calmoduline, présente en grandes quantités dans les cellules du cerveau, possède plusieurs sites de liaisons au calcium. Quand ils sont occupés, elle change de configuration tertiaire et peut alors interagir avec un grand nombre d'enzymes et de transporteurs. Parmi ces cibles, outre les protéines kinases à l'origine de la libération des neurotransmetteurs, les plus notables sont les adényl-cyclases et les AMPC-phosphodiesterases. Cela fait de cette protéine un agent important de régulation du métabolisme de l'AMPC, second messenger majeur impliqué à son tour dans de multiples processus.

Or le plomb peut activer la calmoduline, en se substituant au calcium et en se liant à d'autres sites de cette protéine. Bien que les concentrations pour lesquelles cet effet est perceptible soient, d'après les premières expériences faites à ce sujet, trop fortes pour être impliquées dans la toxicité du plomb environnementale (effet biphasique avec activation maximale à 30 μM d'après Sandhir et al., 1994), les recherches de Kern et Audesirk (1995) ont ensuite diminué ce seuil. En effet, ils ont montré que les expériences précédentes utilisaient parmi les réactifs des chélateurs du plomb qui diminuaient fortement la concentration de Pb^{2+} libre. Pour eux, le plomb stimule l'activité de la calmoduline pour des concentrations de Pb^{2+} libre de l'ordre des picomoles.

Cette activation serait suivie de celle des calmodulines kinases qui à leur tour phosphorylent de nombreuses protéines, et de celle de l'adényl-cyclase qui augmente la concentration d'AMPc activant à son tour la PKA. Des précisions ont par la suite été apportées sur l'impact réel de la calmoduline sur les adényl-cyclases (Xia et Storm, 1997). En effet, les adényl-cyclases (AC) forment une famille hétérogène où 9 isoformes aux mécanismes de régulations propres ont pour l'instant été décrits. Parmi ces isoformes, seuls AC1, 3 et 8 sont régulés par la calmoduline, qui les active en se liant à leurs sous-unités catalytiques, et les inhibent indirectement par la liaison des calmodulines kinases aux récepteurs liant GTP. Or l'activation de AC1, neurospécifique et très fortement présente dans l'hippocampe, et celle de AC8, sont essentielles pour la mémoire à long-terme et la phase tardive de LTP (Wong et al, 1999), ce qui peut s'expliquer par le rôle déjà évoqué dans la figure 4 de l'AMPc dans la régulation de la transcription de gènes spécifiques par la voie des CREB/CRE.

L'existence de nombreuses autres conséquences neurologiques est vraisemblable, la calmoduline ayant été impliquée dans de multiples atteintes du système nerveux central comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson et l'épilepsie (Sandhir et Gill, 1994).

L'action du plomb sur le métabolisme de l'AMPc ne s'arrête pas là, car il a été démontré, à l'inverse, qu'il pouvait directement inhiber l'activation des adényl-cyclases du cortex cérébral, du cervelet et du tronc cérébral. Rodrigues et al. (1999) ont ainsi observé que le plomb inhibait l'activité des adényl-cyclases en réagissant avec les groupements sulfhydryles des sous-unités catalytiques et aussi avec les protéines G, sans toutefois préciser quels étaient les isoformes impliqués.

C – Le plomb perturbe la transduction de signal assurée par PKC

Une autre protéine nécessitant du calcium pour son activation et qui est affectée par le plomb est la protéine kinase C, que des concentrations picomolaires de plomb se sont révélées suffisantes pour activer avec la même ampleur que des concentrations micromolaires de calcium. Les conséquences d'une exposition au plomb sur l'activité de PKC ont déjà été évoquées à propos des facteurs sur lesquels le plomb intervient pour altérer LTP. La conclusion était que **bien que le plomb ait un effet activateur ou inhibiteur pour des concentrations spécifiques de chaque isoforme de PKC, on considère qu'aux concentrations dont il est ici question (10^{-12} à 10^{-8} M de Pb^{2+} libre), le plomb stimule l'activation de PKC.**

C'est vraisemblablement en grande partie par cet effet que le plomb interfère avec le développement du système nerveux central. En effet, PKC est à l'origine de la plupart des mécanismes activité-dépendants qui renforcent les synapses pendant la période critique du développement où les expériences postnatales sont cruciales pour le développement cognitif. Les modèles comme LTP ont souligné l'importance de PKC dans la plasticité synaptique. De même des processus importants pour la transmission synaptique comme la biosynthèse des neurotransmetteurs, les interactions ligands-récepteurs, la conductance des canaux ioniques et la ramification dendritique sont en partie régulées par PKC et peuvent donc être affectées par le plomb. L'induction de certains gènes par PKC fait également de ces gènes une cible potentielle pour le plomb (Bressler et al., 1999).

La protéine kinase C est donc impliquée, en tant que transducteur de signal, dans de nombreuses voies moléculaires, qui sont par là autant de cibles pouvant expliquer les déficits de développement neurocomportemental consécutif à une exposition au plomb.

3 – L'exposition au plomb interfère avec l'expression des gènes et l'intégrité de l'ADN

Que ce soit par l'altération de l'activité des seconds messagers, qui se transloquent ensuite dans le noyau, ou bien du fait de sa propre présence, le plomb parvient par de nombreux moyens à perturber l'expression des gènes, voire même à altérer l'intégrité de l'ADN. Ainsi, non seulement il affecte la liaison de certains facteurs de transcription à l'ADN, mais il module également directement l'expression de certains gènes.

A – Perturbation par le plomb du système des troisièmes messagers : les facteurs de transcription

Comme cela a été évoqué précédemment (3^{ème} partie-I-2-B), une exposition précoce au plomb provoque un pic de liaison prématuré des facteurs de transcriptions ZFP (Egr1 et Sp1). Cet effet passe par plusieurs actions dont la liaison du plomb à la région sensible au zinc et l'activation de la voie ERK/MAPK.

Mais les ZFP ne sont pas les seuls facteurs de transcription dont l'action est perturbée par le plomb. C'est également le cas pour le complexe Ap1 (Chakraborti et al., 1999). Ce complexe est formé de deux membres de la famille *jun* ou bien d'un membre de la famille *jun* et d'un autre de la famille *fos*, et est responsable de la transcription de nombreux gènes de réponse précoce. Or une étude sur des cellules PC12 exposées à différentes concentrations de plomb a révélé que le plomb à partir de 8 µM stimulait la liaison de Ap1 à l'ADN. Cela a également été noté *in vivo* dans l'hippocampe, le striatum et le cortex de rats exposés au plomb (Ramesh et al., 2001). Cet effet passerait par une augmentation de la synthèse protéique *de novo* et dépendrait de l'activation de PKC.

Le complexe Ap1 jouant un rôle significatif dans la régulation de nombreux gènes importants pour le développement du cerveau (dont la tyrosine hydroxylase et GFAP), il est possible que l'altération de ces gènes par le plomb au cours des périodes critiques du développement contribue en partie à l'effet neurotoxique du plomb chez les enfants.

B – Interaction du plomb avec l'expression de certains gènes

Il paraît évident que le plomb activant la liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription, il stimule ce faisant l'expression des gènes régulés par ces facteurs. Mais il existe d'autres mécanismes d'action par lesquels le plomb interfère avec l'expression des gènes.

Parmi les gènes cibles, on relève les « immediate early response genes », qui codent pour des protéines constitutives des facteurs de transcription. Cela a d'abord été mis en évidence par Kim et al. (1997) qui ont montré que le plomb augmente le taux d'ARNm c-fos dans les cellules PC12 par le biais d'une nouvelle transcription. Puis il ont prouvé que le plomb active également l'expression des gènes c-jun et egr1. Le mécanisme à l'origine de l'activation de c-fos a ensuite été approfondi (Kim et al., 2000). On trouve dans le promoteur de c-fos, trois éléments de contrôle transcriptionnel différemment régulés :

- Un élément AMPc-répondant, requis pour l'induction de c-fos par des effecteurs qui activent la calmoduline kinase II.
- Un élément sérum-répondant (SRE) pour les effecteurs qui activent PKC.
- Un élément cis-inductible qui permet l'induction de c-fos par les cytokines et les facteurs de croissance.

En exposant les cellules PC12 au plomb, les chercheurs ont constaté une augmentation de la liaison du SRE à l'ADN, qui a lieu avant l'augmentation du taux d'ARNm c-fos. Tandis que les inhibiteurs de la calmoduline kinase II n'ont aucun effet sur l'induction de l'ARNm c-fos par le plomb, les inhibiteurs de PKC atténuent cet effet. Ces faits suggèrent que le plomb agisse sur la transcription de c-fos via une action sur PKC.

C'est pourquoi la distribution des isozymes de PKC dans le cytosol et la membrane a été examinée dans les cellules PC12 exposées au plomb, de forts taux de PKC associées à la membrane indiquant une activation de PKC. Il n'y a pas eu de changement dans la distribution des PKC α et β (c-PKC) ni des PKC ξ dans la fraction membranaire des cellules exposées au plomb par rapport au cellules témoins, mais davantage de PKC δ et ϵ (n-PKC) y furent observées. Si l'action du plomb sur c-fos passe effectivement par l'activation des n-PKC, cela signifie que le plomb agit ici non pas en augmentant la concentration de calcium (nécessaire à l'activation des c-PKC) mais en augmentant la concentration en diacylglycérol (DAG). Cela serait envisageable car il a déjà été montré qu'une exposition au plomb augmentait les taux d'inositol triphosphate (IP3), or comme le clivage du phosphoinositol biphosphate résulte dans la production de DAG + IP3, une augmentation par le plomb du taux de IP3 suggère une augmentation concomitante de DAG.

Les résultats de cette étude suggèrent un mécanisme pouvant expliquer les effets à long-terme du plomb sur le système nerveux central. Le neurodéveloppement est caractérisé par la répression et l'expression séquentielle des gènes. La plupart de ces gènes sont régulés par les « immediate early genes ». **La capacité du plomb à moduler le niveau d'expression de ces « immediate early genes » suggère que chez les animaux exposés au plomb ces gènes soient exprimés au mauvais moment**, résultant dans la formation de synapses et une croissance dendritique inappropriées. Ces changements ne se soldent pas nécessairement par une toxicité déclarée, comme un retard mental, mais par des changements plus subtils, comme des déficits d'apprentissage.

C – Le plomb peut porter atteinte à l'intégrité de l'ADN

L'une des causes de cet effet sur l'ADN est bien sûr le fait qu'il favorise l'apparition du processus d'apoptose (cf. supra), qui se traduit notamment par une fragmentation des brins d'ADN.

Mais il a également été prouvé que **le plomb altérerait les capacités de réparation de l'ADN du fait de son interférence avec l'étape de polymérisation ou lors de l'excision de l'ADN défectueux** (Hartwig, 1994).

De plus, **le plomb exercerait un effet génotoxique indirect**, en agissant comme un agent co-mutagène avec l'irradiation aux ultra-violets ou les agents alkylants (Beyersman, 1994).

Ainsi par son action directe ou indirecte sur l'expression des gènes, et notamment de gènes spécifiques du développement cellulaire du système nerveux central, une exposition précoce au plomb pourrait engendrer une perturbation du fonctionnement des cellules nerveuses se traduisant par des déficits cognitifs ou comportementaux.

Conclusion

Le grand nombre de travaux menés sur l'étude de la quantification et de la description des séquelles neuropsychologiques d'une exposition chronique précoce au plomb, et sur la compréhension des origines de ces séquelles, montrent à la fois l'importance et la complexité de ce sujet.

En effet, si le saturnisme est aujourd'hui encore un problème de santé publique, cela vient du fait que même de faibles expositions au plomb peuvent contribuer à altérer le comportement et les facultés cognitives des enfants. Les conclusions partielles de la première partie qui traitait ce fait sont reprises dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Incidences d'une exposition environnementale précoce au plomb sur le développement neuropsychologique.

Etudes épidémiologiques : plomb et développement intellectuel chez l'enfant.
- Enfants plus exposés et plus vulnérables. - Faible corrélation négative plombémie-QI (déficit de 2 points par augmentation de 10 µg/dl). - Altération modeste du comportement. - Importance de l'effet modulateur des facteurs familiaux et sociaux. - Persistance dans le temps de ces déficits (cependant éventuellement réversibles à terme).
Etudes expérimentales : plomb et diminution des performances chez l'animal.
- Diminution des performances spatiales. - Mise en évidence d'un comportement d'obstination, également décrit comme un déficit d'associativité. - Distractibilité accrue. - Divergences selon les tâches et au sein d'une même tâche sur l'existence d'une persistance des effets du plomb (parfois avérée). - Gestation et lactation : périodes de plus forte sensibilité.

Si l'étude des mécanismes permettant d'expliquer la neurotoxicité du plomb s'est ensuite avérée ardue, c'est non seulement en raison de la diversité des protocoles d'expérimentation dans les laboratoires et de la subtilité des effets du plomb à des taux si bas (plombémie comprise entre 5 et 60 µg/dl), mais aussi parce que nos connaissances sur les mécanismes moléculaires à la base des processus d'apprentissage et de mémoire sont loin d'être complètes. Considérant que LTP et LTD pourraient être des modèles de ce processus de mémorisation, il a alors été montré qu'une exposition précoce au plomb altérerait ces phénomènes, comme cela est rapporté dans le tableau IX.

Tableau IX : Exposition précoce au plomb et mémorisation.

Plomb et LTP/ LTD.	
LTP	- ↑ seuil d'induction de LTP, ↓ amplitude et durée. - Effet plus marqué lors d'une exposition précoce. - Effet biphasique.
LTD	- Freine l'induction de LTD. - ↓ amplitude.
Plomb et acteurs de l'induction et du maintien de LTP/ LTD.	
Glutamate	- ↓ libération de glutamate induite par dépolarisation. - Relation dose-effet biphasique.
PKC	- Effet activateur du plomb en général. - Variabilité des effets du plomb selon l'âge et les isozymes de PKC exprimées.
NMDA	- Relation dose-effet biphasique. - ↑ densité des récepteurs NMDA. - Modifie l'évolution de la composition du récepteur.

La complexité des rapports entre exposition au plomb et altération des capacités intellectuelles vient également du fait qu'une exposition précoce au plomb perturbe un très grand nombre d'acteurs du fonctionnement cellulaire du système nerveux central, modifiant notamment la morphologie et les systèmes de communications cellulaires. Les différents points d'intervention du plomb sont relevés dans le tableau X.

Tableau X : Sites d'interactions entre plomb et fonctionnement du système nerveux central.

Plomb et développement du système nerveux central.	
Cytoarchitecture	- Inhibition du développement des neurites. - Déficit cholinergique dans l'hippocampe. - Retard dans la conversion NCAM-E→NCAM-A et ↓ activation de la polysialylation lors de la consolidation de la mémoire (↓ stabilisation des synapses).
Gènes de croissance et de développement cellulaire	- ↑ taux d'ARNm GFAP→ accélère la maturation des astrocytes. - Altération du profil de développement de GAP-43→ arrêt prématuré de la croissance axonale. - ↑ taux d'ARNm MBP et PLP, composants de la myéline. - Stimule activation ERK/MAPK. => Différenciation cellulaire prématurée.
Cytotoxicité	- Dans l'astrocyte, ↑ taux de glutamate et ↓ activité de l'ATPase transportant le cuivre. - ↑ synthèse de radicaux libres et [Ca]²⁺_i. => Gonflement astrocytaire, liperoxydation, apoptose.
Plomb et communication cellulaire.	
Neurotransmetteurs	- Hypofonction cholinergique par mort des neurones et ↓ expression des gènes cholinergiques. - ↓ libération glutamate et altération des propriétés des récepteurs NMDA et AMPA. - Modulation du système dopaminergique.
Seconds messagers	- ↑ [Ca]²⁺_i et se substitue au calcium. - Active PKC.
Expression des gènes	- Active certains facteurs de transcription (ZFP, Ap1). - Altère expression des IERG.

Bien que toutes ces conclusions doivent parfois être tempérées par l'existence de travaux contradictoires, il n'en reste pas moins qu'au vu des multiples atteintes portées par une exposition environnementale précoce au plomb au développement et au fonctionnement du système nerveux central, il paraît impossible de reléguer le saturnisme à un trouble mineur.

Il devient dès lors nécessaire d'accentuer la surveillance et la prévention de cette maladie. Ceci n'est possible qu'en réduisant l'exposition au plomb (recensement et remplacement des locaux vétustes, essence sans plomb, filtres au plomb sur la robinetterie...) et en dépistant et prenant en charge précocement les enfants exposés. Cependant, s'il est vrai que l'on puisse espérer que la prise de conscience de la neurotoxicité du plomb même aux faibles doses rencontrées dans nos pays permette une amélioration assez rapide de la situation, cet optimisme ne paraît pas de mise concernant les pays émergents où l'on peut craindre que le saturnisme reste durablement un problème.

Bibliographie

Par ordre alphabétique :

- AREOLA OO, JADHAV AL (2001). Low-level lead exposure modulates effects of quinpirole and eticlopride on response rates in a fixed-interval schedule. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **69**, 151-156.
- ASCHNER M, ALLEN JW, KIMELBERG HK, LOPACHIN RM, STREIT WJ (1999). Glial cells in neurotoxicity development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 151-173.
- BAILEY C, BARTSCH D, KANDEL E (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13445-13452.
- BANKS E, FERRETTI L, SHUCARD D (1997). Effects of low level lead exposure on cognitive function in children: a review of behavioural, neuropsychological and biological evidence. *Neurotoxicology*, **18**, 237-282.
- BEAR M (1996). A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13453-13459.
- BEAR M, MALENKA R (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current biology*, **4**, 389-399.
- BELLINGER D, STILES K (1993). Epidemiologic approaches to assessing the developmental toxicity of lead. *Neurotoxicology*, **14** (2-3), 151-160.
- BERTHIER M (2001). Saturnisme: la loi et son application. *Arch. Pédiatr.*, **8** suppl.2, 508-10.
- BEYERSMAN D (1994). Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicol. Lett.*, **72**, 333-338.
- BIELARCZYK H, TOMSIG JL, SUSKIW JB (1994). Perinatal low-level lead exposure and the septo-hippocampal cholinergic system: selective reduction of muscarinic receptors and cholineacetyltransferase in the rat septum. *Brain Res.*, **643**, 211-217.
- BONDY SC, LEBEL CP (1993). The relationship between excitotoxicity and oxydative stress in the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 633-642.
- BOURJEILY N, SUSKIW JB (1997). Developmental cholinotoxicity of lead: loss of septal cholinergic neurons and long-term changes in cholinergic innervation of the hippocampus in perinatally lead-exposed rats. *Brain Res.*, **771**, 319-328.
- BRAGA MF, PEREIRA EF, ALBUQUERQUE EX (1999). Nanomolar concentrations of lead inhibit glutamatergic and GABAergic transmission in hippocampal neurons. *Brain Res.*, **826**, 22-34.
- BRESSLER J, KIM K, CHAKRABORTI T, GOLDSTEIN G (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, **24**, 595-600.

- BROCKEL B, CORY-SLECHTA D (1995). Lead, attention and impulsive behavior: changes in a fixed-ratio waiting-for-reward paradigm. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **60**, 545-552.
- CHAKRABORTI T, KIM KA, GOLDSTEIN GG, BRESSLER JP (1999). Increased AP-1 DNA binding activity in PC12 cells treated with lead. *J. Neurochem.*, **73**, 187-194.
- CHEN HH, MA T, HO IK (1999). Protein kinase C in rat brain is altered by developmental lead exposure. *Neurochem. Res.*, **24**, 415-421.
- CHEN HH, MA T, HO IK (2001). Effects of developmental lead on inhibitory avoidance learning and glutamate receptors in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **9**, 185-191.
- CHEN C, TONEGAWA S (1997). Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **20**, 157-184.
- CHEYMOL J (1999). Le saturnisme infantile. *Médecine et enfance*, **10**, 545-550.
- CHRISTIE B, KERR S, WICKLIFFE A (1994). Flip side of synaptic plasticity: long-term depression mechanisms in the hippocampus. *Hippocampus*, **4**, 127-135.
- COHN J, COX C, CORY-SLECHTA DA (1993). The effect of lead exposure on learning in a multiple repeated acquisition and performance schedule. *Neurotoxicology*, **14** (2-3), 329-346.
- COHN J, CORY-SLECHTA DA (1993). Subsensitivity of lead-exposed rats to the accuracy-impairing and rate-altering effects of MK-801 on a multiple schedule of repeated learning and performance. *Brain Res.*, **600**, 208-218.
- COHN J, CORY-SLECHTA DA (1994). Lead exposure potentiates the effects of NMDA on repeated learning. *Neurotoxicol. Teratol.*, **16**, 455-465.
- COPPY AA, LESNIAK J, ZIEBA D, SCHANNE FAX (1996). The effects of lead on PKC isoforms. *Ann. NY Acad. Sci.*, 304-306.
- CORY-SELCHTA DA (1995). Relationships between lead-induced learning impairments and changes in dopaminergic, cholinergic, and glutamatergic neurotransmitter system functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 391-415.
- CORY-SELCHTA DA (1997). Relationships between Pb-induced changes in neurotransmitter system function and behavioral toxicity. *Neurotoxicology*, **18**, 673-688.
- CORY-SLECHTA DA, GARCIA-OSUNA M, GREENAMYRE JT (1997). Lead-induced changes in NMDA receptor complex binding: correlations with learning accuracy and with sensitivity to learning impairments caused by MK-801 and NMDA administration. *Behav. Brain Res.*, **85**, 161-174.
- CORY-SLECHTA DA, MCCOY L, RICHFIELD EK (1997). Time course and regional basis of Pb-induced changes in MK-801 binding: reversal by chronic treatment with the dopamine agonist apomorphine but not the D1 agonist SKF-82958. *J. Neurochem.*, **68**, 2012-2023.
- CORY-SLECHTA DA, O'MARA DJ, BROCKEL BJ (1998). Nucleus accumbens dopaminergic medication of fixed interval schedule-controlled behavior and its modulation by low-level lead exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 794-805.

- ENGLE MJ, VOLPE JJ (1990). Glutamine synthetase activity of developing astrocytes is inhibited in vitro by very low concentrations of lead. *Dev. Brain Res.*, **55**, 283-287.
- FINKELSTEIN Y, MARKOWITZ M, ROSEN J (1998). Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. *Brain Res. Rev.*, **27**, 168-176.
- FRANKLIN C, INSKIP M, BACCANALE C, EDWARDS C, MANTON W (1997). Use of sequentially administered stable lead isotope to investigate changes in blood lead during pregnancy in a non human primate. *Environ Health Perspect.*, **105**, 109-119.
- GARAVAN H, MORGAN R, LEVITSKY D, HERMER-VASQUEZ L, STRUPP B (2000). Enduring effects of early lead exposure : evidence for a specific deficit in associative ability. *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 151-164.
- GILBERT ME, LASLEY SM (1998). Chronic lead reduces the ability of MK-801 to suppress long-term potentiation in rat dentate gyrus. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **24**, 237.
- GILBERT ME, MACK CM, LASLEY SM (1999). The influence of developmental period of lead exposure on long-term potentiation in the adult rat dentate gyrus *in vivo*. *Neurotoxicology*, **20**, 57-70.
- GILBERT ME, MACK CM, LASLEY SM (1999). Chronic developmental lead-exposure and hippocampal long-term potentiation: biphasic dose-response relationship. *Neurotoxicology*, **20**, 71-82.
- GUILARTE T, MCGLOTHAN JL (1998). Hippocampal NMDA receptor mRNA undergoes subunit specific changes during developmental lead exposure. *Brain Res.*, **790**, 98-107.
- GUILARTE TR, MICELI RC, ALTMANN L, WEINSBERG F, WINNEKE G, WIEGAND H (1993). Chronic prenatal and postnatal Pb²⁺ exposure increases MK-801 binding sites in adult rat forebrain. *Eur. J. Pharmacol.*, **248**, 273-275.
- GUILARTE TR, MCGLOTHAN JL, NIHEI MK (2000). Hippocampal expression of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1) subunit splice variant mRNA is altered by developmental exposure to Pb²⁺. *Mol. Brain Res.*, **76**, 299-306.
- GUTOWSKY M, ALTMAN M, SVEINSSON K, WIEGAND H (1997). Postnatal development of synaptic plasticity in the CA3 hippocampal region of control and lead-exposed Wistar rats. *Dev. Brain Res.*, **98**, 82-90.
- GUTOWSKY M, ALTMAN M, SVEINSSON K, WIEGAND H (1998). Synaptic plasticity in the CA1 and CA3 hippocampal region of pre- and postnatally lead-exposed rats. *Toxicol. Lett.*, **95**, 195-203.
- HANAS JS, RODGERS JS, BANTLE JA, CHENG YG (1999). Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys2His2 zinc finger proteins. *Molecular Pharmacol.*, **56**, 982-988.
- HANSSON E, MUYDERMAN H, LEONOVA J, ALLANSSON L, SINCLAIR J, BLOMSTRAND F et al. (2000). Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem. Int.*, **37**, 317-329.
- HARTWIG A (1994). Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.*, **102**, 45-50.
- HE L, POBLENZ AT, MEDRANO CJ, FOX DA (2000). Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12175-12184.

- HÖLSCHER C(1999). Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J. Neurosci. Res.*, **58**, 62-75.
- HUSSAIN RJ, PARSONS PJ, CARPENTER DO (2000). Effects of lead on long-term potentiation hippocampal CA3 vary with age. *Dev. Brain Res.*, **121**, 243-252.
- IKEMOTO S, PANKSEPP J (1999). The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res. Rev.*, **31**, 6-41.
- IZQUIERDO I, MEDINA J (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*, **68**, 285-316.
- JADHAV AL, RAMESH GT, GUNASEKAR PG (2000). Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb²⁺-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **115**, 89-98.
- JETT D, KUHLMANN A, FARMER S, GUILARTE T (1997). Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **57**, 271-279.
- KALA SV, JADHAV AL (1995). Low level lead exposure decreases *in vivo* release of dopamine in the rat nucleus accumbens: a microdialysis study. *J. Neurochem.*, **65**, 1631-1635.
- KERN M, AUDESIRK G (1995). Inorganic lead may inhibit neurite development in cultured rat hippocampal neurons through hyperphosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **134**, 111-123.
- KERN M, AUDESIRK T, AUDESIRK G (1993). Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cortical neurons in culture. *Neurotoxicology*, **14**, 319-328.
- KIM KA, ANNADATA M, GOLDSTEIN G, BRESSLER JP (1997). Induction of *c-fos* mRNA by lead in PC12 cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **15**, 175-182.
- KIM KA, CHAKRABORTI T, GOLDSTEIN GW, BRESSLER JP (2000). Immediate early gene expression in PC12 3112 106Jci3112 106TT8 1 Tf-0.0012 Tc 12 0 0

- LASLEY SM, GREEN MC, GILBERT ME (1999). Influence of exposure period on in vivo hippocampal glutamate and GABA release in rats chronically exposed to lead. *Neurotoxicology*, **20**, 619-630.
- LEDRANS M, BOUDOT J (1997). Surveillance du saturnisme infantile en France. Bilan des activités de dépistage. *Réseau national de santé publique. Direction générale de la santé. Ministère de l'emploi et de la solidarité.*
- LIU MY, HSIEH WC, YANG BC (2000). In vitro aberrant gene expression as the indicator of lead-induced neurotoxicity in U-373MG cells. *Toxicology*, **147**, 59-64.
- LOIKKANEN JJ, NAARALA J, SAVOLAINEN KM (1998). Modification of glutamate-induced oxydative stress by lead : the role of extracellular calcium. *Free Rad. Biol. Med.*, **24**, 377-384.
- LÜTHI A, LAURENT JP, FIGUROV A, MULLER D, SCHACHNER M (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature*, **372**, 777-779.
- MA T, CHEN HH, CHANG HL, HUME AS, HO IK (1997). Effects of chronic lead exposure on MK-801 binding in the brain of rat. *Toxicol. Lett.*, **92**, 59-66.
- MCMICHAEL A (1995). Environmental lead and intellectual development: strengths and limitations of epidemiological research. *Neurotoxicol. Teratol.*, **17**, 237-240.
- MOREIRA EG, ROSA GJ, BARROS SB, VASSILIEF VS, VASSILIEF I (2001). Antioxydant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology*, **169**, 145-151.
- MORGAN R, LEVITSKY D, STRUPP B (2000). Effects of chronic lead exposure on learning and reaction time in a visual discrimination task. *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 337-345.
- MURPHY KJ, REGAN CM (1999). Low-level lead exposure in the early postnatal period results in persisting neuroplastic deficits associated with memory consolidation. *J. Neurochem.*, **72**, 2099-2104.
- MURPHY KJ, FOX GB, KELLY J, REGAN CM (1995). Influence of toxicants on neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity in the developing and adult animal: persistent effects of chronic perinatal low-level lead exposure. *Toxicol. Lett.*, **82-83**, 271-276.
- NAARALA JT , LOIKKANE JJ, RUOTSALAINEN MH, SAVOILANEN KM (1995). Lead amplifies glutamate-induced oxydative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, **19**, 689-693.
- NIHEI MK, GUILARTE T (1999). NMDAR-2A subunit protein expression is reduced in the hippocampus of rats exposed to Pb²⁺ during development. *Mol. Brain Res.*, **66**, 42-49.
- OBERTO A, MARKS N, EVANS HL, GUIDOTTI A (1996). Lead promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 435-442.
- O'MALLEY A, O'CONNEL C, REGAN CM (1998). Ultrastructural analysis reveals avoidance conditioning to induce a transient increase in hippocampal dentate spine density in the 6h post-training period of consolidation. *Neuroscience*, **87**, 607-613.
- PALMINGER HALLEN I, JORHEM L, OSKARSSON A (1995). Placental and lactational transfert of lead in rats: a study on the lactational process and effects on offspring. *Arch. Toxicol.*, **69**, 596-602.



- PARTL S, HERBST H, SCHAEFER F, STOLTENBURG-DIDINGER G (1998). GFAP gene expression is altered in young rats following developmental low level lead exposure. *Neurotoxicology*, **19**, 547-552.
- PATRICK GW, ANDERSON WJ (2000). Dendritic alterations of cerebellar Purkinje neurons in postnatally lead-exposed kittens. *Dev. Neurosci.*, **22**, 320-328.
- RAMESH GT, MANNA SK, AGGARWAL BB, JADHAV AL (2001). Lead exposure activates nuclear factor kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase and caspases in the rat brain. *Toxicol. Lett.*, **123**, 195-207.
- RAMIN SM, PORTER JC (1997). A study of the cellular mechanism by which lead affects catecholamine secretion. *Life Sciences*, **61**, 1313-1321.
- REDDY GR, ZAWIA NH (2000). Lead exposure alters Egr-1 DNA-binding in the neonatal rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience*, **18**, 791-795.
- REGAN CM (1993). Neural cell adhesion molecules, neuronal development and lead toxicity. *Neurotoxicology*, **14**, 69-74.
- REGAN CM, KEEGAN K (1990). Neuroteratological consequences of chronic low-level lead exposure. *Dev. Pharmacol. Ther.*, **15**, 189-195.
- REINHOLTZ MM, BERTICS PJ, MILETIC V (1999). Chronic exposure to lead acetate affects the development of protein kinase C activity and the distribution of the PKC γ isozyme in the rat hippocampus. *Neurotoxicology*, **20**, 609-618.
- RICE D (1993). Lead-induced changes in learning: evidence for behavioural mechanisms from experimental animal studies. *Neurotoxicology*, **14** (2-3), 167-178.
- RICE D, BARONE S (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from human and animal models. *Environ. Health Perspect.*, **108** suppl.3, 511-533.
- RISON R, STANTON P (1995). Long-term potentiation and N-methyl-D-aspartate receptors: foundations of memory and neurologic disease? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **19**, 533-552.
- RODIER PM (1995). Developing brain as a target of toxicity. *Envir. Health Persp.*, **6**, 73-76.
- RODRIGUES AL, REGNER A, RUBIN MA, SOUZA DO (1999). Effects of lead on adényl cyclase activity in rat cerebral cortex. *Neurochem. Res.*, **24**, 1037-1042.
- RUAN DY, CHEN JT, ZHAO C, XU YZ, WANG M, ZHAO WF (1998). Impairment of long-term potentiation and paired-pulse facilitation in rat hippocampal dentate gyrus following developmental lead exposure in vivo. *Brain Res.*, **806**, 196-201.
- SANDHIR R, GILL KD (1994). Effects of lead on the biological activity of calmoduline in rat brain. *Exp. Mol. Path.*, **61**, 69-75.
- SANDHIR R, JULKA D, GILL KD (1994). Liperoxydative damage of lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol. Toxicol.*, **74**, 66-71.
- SAVOLAINEN KM, LOIKKANEN J, EERIKÄINEN S, NAARALA J (1998). Interactions of excitatory neurotransmitters and xenobiotics in excitotoxicity and oxydative stress: glutamate and lead. *Toxicol. Lett.*, **102-102**, 363-367.
- SCHMITT T, ZAWIA N, HARRY J (1996). GAP-43 mRNA expression in the developing rat brain: alterations following lead-acetate exposure. *Neurotoxicology*, **17**, 407-414.

- SCHNEIDER J, LEE M, ANDERSON D, ZUCK L, LIDSKY T (2001). Enriched environment during development is protective against lead-induced neurotoxicity. *Brain Res.*, **896**, 48-55.
- SHEN X, WU S, YAN C (2001). Impacts of low-level lead exposure on development of children: recent studies in China. *Clinica Chimica Acta*, **313**, 217-220.
- SIMONS TJB (1993). Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. *Neurotoxicology*, **14**, 77-86.
- SUI L, GE SY, RUAN DY, CHEN JT, XU YZ, WANG M (2000). Age-related impairment of long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus following developmental lead exposure *in vitro*. *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 381-387.
- SUI L, RUAN DY, GE SY, MENG XM (2000). Two components of long-term depression are impaired by chronic lead exposure in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus *in vitro*. *Neurotoxicol. Teratol.*, **22**, 741-749.
- SUN X, TIAN X, SUSKIW JB (1997). Reduction of choline acetyltransferase mRNA in the septum of developing rat exposed to inorganic lead. *Neurotoxicology*, **18**, 201-208.
- SUN X, TIAN X, SUSKIW JB (1997). Reduction of vesicular acetylcholine transporter mRNA in the rat septum following lead exposure. *Neuroreport*, **8**, 891-894.
- SUN X, TIAN X, TOMSIG JL, SUSKIW JB (1999). Analysis of differential effects of lead on protein kinase C isozymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 40-45.
- TIAN X, BOURJEILY N, BIELARCZYK H, SUSKIW JB (1995). Reduced densities of sodium-dependent hemicholinium-3 binding sites in hippocampus of developmental rats following perinatal low-level lead exposure. *Dev. Brain Res.*, **86**, 268-274.
- TIAN X, SUN X, SUSKIW JB (2000). Upregulation of tyrosine hydroxylase and downregulation of choline acetyltransferase in lead-exposed PC12 cells: the role of PKC activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **167**, 246-252.
- TIFFANY-CASTIGLIONI E, QIAN Y (2001). Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology*, **22**, 577-592.
- TONG S (1998). Lead exposure and cognitive development: persistence and a dynamic pattern. *J. Paediatr. Child Health.*, **34**, 114-118.
- WIGG NR (2001). Low-level lead exposure and children. *J. Paediatr. Child Health*, **37**, 423-425.
- WILLIAMS TM, NDIFOR AM, NEARY JT, REAMS-BROWN RR (2000). Lead enhances NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells by potentiating ERK/MAPK activation. *Neurotoxicology*, **21**, 1081-1090.
- WINNEKE G (1996). Inorganic lead as a developmental neurotoxicant: some basic issues and the Düsseldorf experience. *Neurotoxicology*, **17** (3-4), 565-580.
- WINNEKE G, LILIENTHAL H, KRÄMER U (1996). The neurobehavioural toxicology and teratology of lead. *Arch. Toxicol. Suppl.*, **18**, 57-70.
- WONG ST, ATHOS J, FIGUEROA X, PINEDA VV, SCHAEFER ML, CHAVKIN CC et al. (1999). Calcium-stimulated adenyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*, **23**, 787-798.

- XIA Z, STORM DR (1997). Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation. *Current opinion in neurobiology*, **7**, 391-396.
- ZAO W, RUAN DY XU YZ CHEN J, WANG M, GE SY(1999). The effects of chronic lead exposure on long-term depression in area CA1 and dentate gyrus of rat hippocampus in vitro. *Brain Res.*, **818**, 153-159.
- ZAWIA NH, HARRY GJ (1995). Exposure to lead acetate modulates the developmental expression of myelin genes in the rat frontal lobe. *Int. J. Devl. Neuroscience*, **13**, 639-644.
- ZAWIA NH, HARRY GJ (1996). Developmental exposure to lead interferes with glial and neuronal differential gene expression in the rat cerebellum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 43-47.
- ZAWIA NH, SHARAN R, BRYDIE M, OYAMA T, CRUMPTON T (1998). Sp1 as a target site for metal-induced perturbations of transcriptional regulation of developmental brain gene expression. *Dev. Brain Res.*, **107**, 291-298.
- ZHENG W (2001). Neurotoxicology of the brain barrier system: new implications. *Clinical Toxicol.*, **39**, 711-719.
- ZUCH CL, O'MARA DJ, CORY-SLECHTA DA (1998). Low-level lead exposure selectively enhances dopamine overflow in nucleus accumbens: an in vivo electrochemistry time course assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **150**, 174-185.

Glossaire des abréviations utilisées

AC : adényl cyclase.
AChE : acétylcholine estérase.
CaMKII : protéine kinase calmoduline dépendante.
CBC : child behavior checklist.
ChAT : choline acétyltransférase.
CREB : cAMP response element binding protein.
CSH (neurones) : neurones cholinergiques issus de la voie septo-hippocampale.
DG : gyrus denté.
ERK : extracellular signal regulated protein kinase.
G : jour de gestation.
GAP-43 : growth associated protein-43.
GCI : general cognitive index.
GFAP : glial fibrillary acidic protein.
GL : depuis la gestation (gestation-life).
GW : de la gestation au sevrage (gestation-weaning).
HC-3 : hémicholinium-3.
HOME : observation à domicile afin d'évaluer l'environnement.
LTD : dépression à long-terme.
LTP : potentiation à long-terme.
MAPK : mitogen activated protein kinase.
MBP : myelin basis protein.
MS/vDB : bande diagonale verticale du septum médian.
NCAM : molécule d'adhésion des cellules neuronales.
MDI : index de développement mental.
NMDA : N-methyl -D-aspartate.
Cellule PC12 : cellule de phéochromocytome, modèle pour l'étude des neurones.
PDI : index de développement psychomoteur.
PKA : protéine kinase AMPc dépendante.
PKC : protéine kinase C.
PLP : proteolipid protein.
PN : jours depuis la naissance.
QI : quotient intellectuel.
SDHACU : système de récupération de l'acétylcholine.
SRE : serum response element.
TMT : trail making test.
VAcHT : transporteur vésiculaire de l'acétylcholine.
VRD : Vienna rection device.
W : jour du sevrage (weaning).

WISC : Wechsler intelligence test for children.

WL : depuis le sevrage (weaning-life).

ZFP : zinc finger protein.

* : auteurs cités dans les articles exploités mais pas étudiés personnellement donc absents de la bibliographie.

NEUROTOXICITE DU PLOMB PENDANT LE DEVELOPPEMENT

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

NOM et prénom : ROQUET-NOËL Anne-Violaine

RESUME :

Le plomb, reconnu depuis longtemps comme toxique, est aujourd'hui encore un réel problème de santé publique, car neurotoxique même aux taux rencontrés dans l'environnement. De nombreux travaux furent et sont encore menés à ce sujet, dont cette thèse dresse le bilan.

Les enfants sont les plus vulnérables et les plus exposés au plomb, une faible exposition chronique précoce (plombémie supérieure à 10 µg/dl) induisant une diminution des capacités cognitives et une altération du comportement. Dans les modèles animaux, cette exposition au plomb, notamment pendant la gestation et l'allaitement, provoque un déficit de l'apprentissage spatial et des capacités associatives et augmente les comportements de persévérance et la distractibilité, parfois durablement.

Cela s'explique par une diminution de la potentiation et de la dépression à long-terme, bases moléculaires de la mémoire, via l'altération de la libération de glutamate ainsi que de l'activité des protéines kinases C et des récepteurs NMDA.

Plus globalement, l'exposition précoce au plomb perturbe le fonctionnement du système nerveux central. En effet, le plomb altère la morphologie du système nerveux central par sa cytotoxicité et en modifiant sa cytoarchitecture et l'expression des gènes de croissance et de développement cellulaire. Il interagit également avec les différents systèmes de communication cellulaire : neurotransmetteurs (cholinergiques, glutamatergiques, dopaminergiques), seconds messagers (calcium, protéines kinases, AMPc) et facteurs de transcription.

Mots-clés : Plomb

Neurotoxicité

Saturnisme

Développement

Comportement

Apprentissage.

JURY :

Président : Pr

Directeur : Pr Kolf-Clauw.

Assesseur : Pr Crevier-Denoix.

Adresse de l'auteur :

Mme Roquet-Noël Anne-Violaine

Rue Jules Mattez 62430 Sallaumines.

DEVELOPMENTAL NEUROTOXICITY OF LEAD

BIBLIOGRAPHICAL STATEMENT

SURNAME: ROQUET-NOËL

Given name: Anne-Violaine

SUMMARY:

Lead, which has been recognised as toxic for a long time, remains today a real public health problem since it is neurotoxic even at environmental level. Numbers of works have been lead about this matter.

Children are the most susceptible and exposed to lead, as a low level of chronic lead exposure (blood lead level higher than 10 µg/dl) infers a decrease of cognitive abilities and an impairment of behaviour. In animal models, such blood exposure, especially during gestation and lactation, causes a deficit of spatial learning and associative abilities and increases perseveration and distractibility, sometimes on a long-term basis.

That is explained by a decrease of long-term potentiation and depression, molecular supports of memory, through the impairment of both glutamate release and the activity of proteins kinases C and NMDA receptors.

More generally, early lead exposure disturbs the central nervous system functioning. Indeed, lead impairs the morphology of central nervous system by modifying its cytoarchitecture and the expression of growing and cellular development genes and by cytotoxicity. It also interacts with the various systems of cellular communication: neurotransmitters (cholinergic, glutamergic, dopaminergic), second messengers (calcium, proteins kinases, cAMP) and transcription factors.

KEY WORDS: Lead Neurotoxicity Lead poisoning
Development Behaviour Learning.

JURY :

President: Pr

Director: Pr Kolf-Claw205..... chEMC/MC/P <</MCID 14 >>BDCBTr0it71 T71ergi.00Author'1.1dd4 0 10.98 0

Rapport-Gratuit.com