



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Thèse de doctorat en cotutelle

Université de Lorraine (France) et Université de Carthage (Tunisie)



Présentée par : DRIDI Imen

Pour l'obtention de grade de Docteur

De l'Université de Lorraine et de la Faculté des Sciences de Bizerte

Spécialité : Écotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes/ Biologie

Etude des effets neurotoxiques induits par l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris « SWISS» de génération F1 aux anguilles (*Anguilla anguilla* L.) contaminées aux POP dont les polychlorobiphényles

Soutenance prévue le : 12/12/2016

M. Soulimani Rachid	Professeur (Université de Lorraine)	Directeur de these (France)
M. Landoulsi Ahmed	Professeur (Faculté des Sciences de Bizerte)	Directeur de thèse (Tunisie)
M. Bouayed Jaouad	Maitre de conférences (Université de Lorraine)	Examineur (France)
M. Cravedi Jean Pierre	Directeur de recherche (INRA Toulouse)	Rapporteur(France)
Mme Mokni Meherzia	Maitre de conférences (Institut de biotechnologie de Beja)	Rapporteur (Tunisie)
M. Ben Attia Mossadok	Professeur (Faculté des Sciences de Bizerte)	Président de Jury (Tunisie)

Année Universitaire 2016-2017

« Les grandes œuvres jaillissent non de la force, mais de la persévérance »

Samuel Johnson

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents « **Dridi Mohamed Lamin** » et « **Ouni Dalila** », en symbole de reconnaissance à votre soutien inconditionnel, votre amour infini, votre dévouement à notre éducation ma sœur et moi et pour plein de chose que je n'arriverai jamais à les citer toutes. Les mots ne me permettront jamais d'exprimer ma profonde gratitude et mon amour envers vous,

Mon adorable chère sœur « **Dridi Maroua** » qui m'a toujours, soutenu et qui a toujours cru en moi, je t'aime Mriwti,

L'âme de mon très cher mari « **Lakhdhar Mohamed** », tu as cru en moi dans l'ombre. Merci pour ce que tu étais. Paix à ton âme,

A chère Mme **Nakkache Dridi Ferida**, tu es une super tata,

A tous les membres de la famille « **Dridi** » et la famille « **Ouni** » pour tous les bons moments partagés ensemble,

A **Imad** et **Khadija**, un grand merci pour votre amitié, votre fraternité et pour plein de choses...

A mes très chères amies : **Nesrin**, **Hanen**, **Cherifa** et **Dora**, **Hela** en symbole de reconnaissance à votre amitié qui a résisté à la distance et aux années, je sais bien que je pourrai toujours compter sur vous comme vous pouvez compter sur moi. Je n'oublierai jamais vos petits messages et les courtes discussions qui m'apportaient un énorme réconfort.

Remerciements

Bien que seul mon nom apparaisse sur la première page de ce manuscrit, ce travail est le fruit d'une large et intense collaboration.

Cette thèse de doctorat a été réalisée dans le cadre d'une convention de cotutelle entre la Faculté des Sciences de Bizerte (Université de Carthage) et l'Université de Lorraine avec le soutien financier du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Tunisien et de l'Agence Nationale de Recherche Française (ANR).

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie le Professeur **Ben Attia Mossadok** qui m'a fait l'honneur de présider le jury. Je remercie notamment Monsieur **Cravedi Jean-Pierre** et Madame **Mokni Meherzia** qui ont accepté la lourde tâche de rapporter ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont à mon directeur de thèse Tunisien, le Professeur **Landoulsi Ahmed** qui m'a fait découvrir le monde de la recherche scientifique, en m'accueillant dans son laboratoire dès que j'étais en master. Il m'a encouragé à enchaîner mes études avec une thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, votre soutien, votre compréhension, et votre direction si efficace, pendant toutes ses années de recherche.

Je suis également infiniment reconnaissante envers mon directeur de thèse Français, le Professeur **Soulimani Rachid**, qui m'a fait confiance et m'a accueilli au sein de son laboratoire à Metz. Je le remercie de m'avoir soutenu dans les moments difficiles par lesquels je suis passée. Merci de m'avoir donné la chance de découvrir les joies de l'enseignement universitaire. Merci pour vos précieux conseils tout au long de la thèse et vos remarques si pertinentes pendant la correction du manuscrit.

Mes remerciements s'adressent à Dr **Bouayed Jaouad**, qui a su me guider et me faire partager ses connaissances pendant la phase d'expérimentation, de rédaction des articles scientifiques.

Remerciements

Mes sincères gratitude vont pour Professeur **Guido Rychen** de m'avoir accueillie au sein du laboratoire URAFPA tout au long de ces années de thèse.

Merci Dr **Jaket Nelly**, pour ton aide dans le test d'actimètre. Merci **Marchioni Sandra** pour ta bonne humeur.

Merci à mes collègues thésards au laboratoire de neurotoxicologie alimentaire et bioactivité à Metz: **Soualeh Nidhal** pour ton aide lors des dosages enzymatiques. Merci **Karkaba Alaa** pour ton amitié et les moments passés ensemble.

Merci à tous les membres du laboratoire de biochimie et biologie moléculaire à Bizerte, même de l'autre côté de l'océan vous m'avez aidé par vos messages et votre amitié.

Enfin Je remercie toutes les personnes qui, d'une quelconque manière, m'ont apporté leur amitié, leur attention, leur encouragement, leur appui et leur assistance pour que je puisse mener à terme ce travail.

Table des matières

<u>Introduction</u>	1
1. Etat de l’art.....	1
2. Problématique.....	2
3. Hypothèse.....	3
4. Objectifs.....	4
<u>Synthèse bibliographique</u>	5
I. Le système nerveux chez les vertébrés	5
1. Les éléments cellulaires du système nerveux.....	5
1.1. Le neurone.....	5
1.2. Les cellules gliales	5
1.2.1. Les cellules gliales du système nerveux central	5
1.2.1. 1. Les astrocytes.....	5
1.2.1.2. Les oligodendrocytes.....	6
1.2.1.3. Les cellules microgliales.....	7
1.2.2. Les cellules gliales du système nerveux périphérique.....	7
1.2.2.1. Les cellules satellites.....	7
1.2.2.2. Les cellules de Schwann.....	7
2. Développement du système nerveux	7
2.1. Mise en place des grandes structures nerveuses.....	7
2.2. Développement du cerveau	9
II. Neurotoxicité développementale	11
1. Définition.....	11
2. Principales causes de la neurotoxicité développementale.....	12
.III. Les substances chimiques neurotoxiques	14

1. Les biphényles polychlorés.....	15
1.1. Propriétés physicochimiques	15
1.2. Applications.....	17
1.3. Dispersion dans l'environnement	18
1.4. Réglementation.....	18
1.5. Neurotoxicité.....	19
2. Le méthylmercure.....	20
2.1. Propriétés physicochimiques.....	20
2.2. Synthèse et dispersion dans l'environnement	20
2.4. Réglementation.....	21
2.5. Neurotoxicité.....	22
3. Le plomb.....	23
3.1. Propriétés physicochimiques.....	23
3.2. Applications.....	23
3.3. Dispersion dans l'environnement.....	23
3.4. Réglementation.....	24
3.5. Neurotoxicité.....	24
4. Le fluorure.....	25
4.1. Propriétés physicochimiques.....	25
4.2. Applications.....	25
4.3. Dispersion dans l'environnement	26
4.4. Réglementation.....	26
4.5. Neurotoxicité.....	27
5. Le dichlorodiphényltrichloroéthane.....	27
5.1. Propriétés physicochimiques.....	27
5.2. Synthèse et utilisation.....	27
5.3. Dispersion dans l'environnement.....	27
5.4. Réglementation.....	28

5.5. Neurotoxicité.....	29
6. Les éthers diphenyliques polybromés.....	29
6.1. Propriétés physicochimiques.....	30
6.2. Synthèse et utilisation.....	30
6.3. Dispersion dans l'environnement	30
6.4. Réglementations.....	30
6.5. Neurotoxicité.....	30
IV. Le concept de l'approche bénéfice/risque liée à l'alimentation.....	31
V. Les bénéfices et les risques liés à la consommation du poisson.....	33
1. Les bénéfices liés à la consommation du poisson.....	33
2. Les risques liés à la consommation du poisson.....	34
3. Modèle d'étude: l'anguille Européenne (<i>Anguilla anguilla</i> L.).....	34
3.1. Classification.....	34
3.2. Cycle biologique.....	34
3.2.1. La phase de reproduction en mer des Sargasses.....	35
3.2.2. Première migration : de la mer des Sargasses vers l'Europe et l'Afrique du nord.....	35
3.2.3. Première métamorphose : de la larve leptocephale à la civelle.....	35
3.2.4. Deuxième métamorphose : du jaune à l'argenté.....	37
3.2.5. Deuxième migration : de l'Europe et l'Afrique du nord vers de la mer des Sargasses.....	38
<u>Matériels et méthodes</u>.....	40
I. La matière première : Les anguilles	40
II. Analyses chimiques des anguilles.....	40
1. Analyse des teneurs du muscle de l'anguille en PCB-NDL.....	40
2. Analyse des teneurs des muscles d'anguilles en métaux lourds.....	40
2.1. Minéralisation des échantillons	40
2.2. Analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS).....	41
2.3. Analyse des teneurs des muscles d'anguilles en mercure.....	41
III. Animaux et conditions d'hébergement.....	41

IV. Mise en reproduction des souris et traitement des femelles gestantes allaitantes.....	42
V. Choix des doses	44
VI. Préparation de l'aliment et exposition des animaux	44
VII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur d'apprentissage et la mémoire	47
1. Test du labyrinthe en « Y » : Alternance spontanée (JPN 38).....	47
2. Test de la piscine de Morris (JPN 120-123).....	48
VIII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité motrice	49
3. Test de l'open field (JPN 47, 195 et 329)	49
4. Test de l'actimètre (JPN 305).....	51
IX. Effet « depressive like » de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les souris de génération F1.....	52
5. Test de la suspension caudale (JPN 55 et 336-337).....	52
6. Test de la nage forcée (JPN 200 et 336-337).....	53
X. Prélèvements (JPN 338)	55
XI. Dosages biochimiques.....	55
1. Dosage des protéines totales.....	55
2. Dosage du taux Malondialdéhyde (MDA).....	56
3. Dosage des protéines carbonylées.....	57
4. Détermination de l'activité des superoxydes dismutases.....	58
5. Détermination de l'activité de la catalase.....	58
6. Détermination de l'activité du glutathion peroxydase.....	59
7. Dosage de l'acétylcholinestérase (AChE).....	60

XII. Analyse statistique.....	61
<u>Résultats et discussion</u>.....	63
I. Analyses chimiques des anguilles.....	63
1. Résultats.....	63
1.1. Analyse des teneurs des muscles des anguille en PCB-NDL.....	63
1.2. Analyse des teneurs des muscles des anguilles en métaux lourds.....	63
2. Discussion.....	65
II. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelles aux anguilles contamin�es sur le poids corporel	65
III. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelle, aux anguilles contamin�es sur la capacité d'apprentissage et la mémoire.....	67
1. Résultats.....	67
1.1. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelle aux anguilles contamin�es sur la mémoire de travail au JPN 38 dans le test du labyrinthe en « Y »	67
1.2. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelle aux anguilles contamin�es sur la mémoire spatiale de référence et la capacité d'apprentissage aux JPN (120-123) dans le test de la piscine de Morris.....	67
2. Discussion.....	68
IV. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelle aux anguilles contamin�es sur l'activité motrice.....	71
1. Résultats.....	71
1. 1. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelle aux anguilles contamin�es sur l'activité générale dans le test de l'open field (JPN 47, 195, 329).....	71
1.2. Effet de l'exposition g�stacionnelle et lactationnelle aux anguilles contamin�es sur l'activité générale dans le test de l'actimètre (JPN 305).....	74

2. Discussion.....	76
V. Effet « depressive-like » de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les souris de génération F1.....	79
1. Résultats.....	79
1. 1. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur le statut dépressif des souris de génération F1, dans le test de la suspension caudale (JPN 55-336-337)...	79
1.2. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur statut dépressif des souris de génération F1, dans le test de la nage forcée (JPN 200, 336-337).....	82
2. Discussion.....	84
VI. Les dommages oxydatifs causés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées	86
1. Résultats.....	86
1.1. Les dommages oxydatifs causés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les lipides.....	86
1.2. Les dommages oxydatifs causés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les protéines.....	88
VII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité des enzymes antioxydantes.....	89
1. Résultats.....	89
1.1. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'activité de la superoxide dismutase (SOD).....	89
1.2. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'activité de la catalase.....	90

1.3. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'activité de la glutathion peroxydase.....	91
2. Discussion.....	94
VIII. Effet de l'exposition g�estationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'acétylcholinestérase (AChE).....	98
1. Résultats.....	99
2. Discussion.....	102
<u>Discussion générale</u>.....	104
<u>Conclusion générale et perspectives</u>.....	109
<u>Annexes</u>.....	112
<u>Références bibliographiques</u>.....	122
<u>Valorisation des travaux</u>.....	155

Liste des figures

Figure 1: Etapes de mise en place du système nerveux.....	9
Figure 2: Evolution de la vésicule cérébrale primitive en cerveau.....	11
Figure 3: Présentation des processus neurodéveloppementaux clés, chez l'humain, durant la gestation jusqu'à l'âge de 20 ans, en association avec l'évolution des volumes de la matière blanche et la matière grise, au cours du temps.....	13
Figure 4: Proportion relative des substances chimiques dont l'action sur le développement cérébral est documentée.....	15
Figure 5: Structure chimique des PCB.....	16
Figure 6: Structure générale des congénères des éthers diphényliques polybromés (PBDE).....	29
Figure 7: Description schématique de l'approche l'EFSA pour l'évaluation du rapport bénéfiques/risques des aliments.....	32
Figure 8 : Cycle de migration des anguilles.....	35
Figure 9: Photographie d'une anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i> , au stade civelle.....	36
Figure 10: Photographie d'une anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i> , au stade jaune et au stade argenté.....	38
Figure 11: Présentation schématique du Cycle biologique de l'anguille européenne.....	39
Figure 12 : Représentation schématique de la répartition des animaux par groupe expérimental et par sexe.....	43
Figure 13: Représentation schématique du choix des doses.....	44
Figure 14: La représentation schématique du dispositif du test du labyrinthe en « Y ».....	48
Figure 15: La représentation schématique du dispositif du test de la piscine de Morris.....	49

Figure 16: Dispositif du test de l'open field montrant une souris qui explore le milieu.....	50
Figure 17: Dispositif du test de l'actimètre montrant une souris qui explore le milieu.....	51
Figure 18: Le dispositif du test de la suspension caudale montrant trois souris suspendues par la queue.....	52
Figure n 19: Le dispositif du test de la nage forcée montrant trois souris en train d'être testées.	53
Figure 20: Schéma expérimental général mené chez la progéniture de souris exposée durant la gestation et l'allaitement aux aiguilles contaminées et les souris témoins.	54
Figure 21 : Evolution pondérale (g) des souris mâles (A) et femelles (B) exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85, 216 et 400 ng/kg p.c. par rapport aux souris témoins.....	66
Figure 22 : Le nombre de locomotions totales effectuées par les souris mâles (A) et femelles (B) de génération F1, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées, aux POP, dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour comparé à celui des souris témoins dans le test de l'open field aux JPN 47, 195, 329.....	73
Figure 23 : Le temps d'immobilité des souris mâles et femelles de génération F1, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, dont $\Sigma 6$ PCB-NDL la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour comparé à celui des souris témoins dans le test de la suspension caudale réalisé aux JPN 55, 336-337.....	81
Figure 24 : Le temps d'immobilité des souris mâles (A) et femelles (B) de génération F1, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, dont la $\Sigma 6$	

PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour comparé à celui des souris témoins dans le test de la nage forcée aux JPN 200, 336-337.....83

Figure 25: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, dont $\Sigma 6$ PCB-NDL, aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur le taux des protéines carbonylées au niveau du cortex préfrontal, l'hippocampe et le cervelet des souris mâles (A) et femelles (B).....89

Figure 26 : Schéma des systèmes enzymatiques et non-enzymatiques de détoxification des ERO...96

Figure 27 : Schéma représentatif d'une synapse et des mécanismes de neurotransmission cholinergique.....99

Figure 28 : Mécanisme d'action d'une substance neurotoxique sur la transmission de l'influx nerveux. A : Fonctionnement normal, B : Impact d'une substance neurotoxique inhibant l'acétylcholinestérase.....103

Liste des tableaux

Tableau 1: Numéros accordés par l'union internationale de chimie pure (IUPAC) à chacun des 6 PCB-NDL.....	17
Tableau 2: Exemples de noms commerciales de PCB selon leurs pays de production.....	18
Tableau 3: Valeurs Benchmark doses lower confidence limits (BMDL) pour le plomb dans le sang et pour l'ingestion alimentaire déterminées par l'EFSA (2010) pour les effets cardiovasculaires, la néphrotoxicité et la neurotoxicité développementale.....	24
Tableau 4: Caractéristiques physico-chimiques de l'arsenic.....	26
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents traitements utilisés.....	46
Tableau 6 : Teneurs des anguilles pêchées de la Meuse (Belgique) et celles pêchées auprès la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas) en PCB-NDL.....	63
Tableau 7 : Teneurs des anguilles pêchées de la Meuse (Belgique) et celles pêchées auprès la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas) en métaux.....	64
Tableau 8 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur la mémoire de travail, testée dans le labyrinthe en « Y » au JPN 38, sur la capacité d'apprentissage testées et la mémoire spatiale dans le test de Morris aux JPN (120-123).....	69
Tableau 9 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à la chair d'anguilles contaminées contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85 ; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité motrice, testée dans l'actimètre au JPN 305.....	75

Tableau 10: Compilation des données concernant les effets des expositions développementales aux PCB sur l'activité motrice chez les rongeurs.....	78
Tableau 11 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85;216 et 400 ng / kg / jour sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet.....	87
Tableau 12 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à la chair d'anguilles, contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité de la catalase (Cat), de la superoxide dismutase (SOD) et du glutathion peroxydase (GPx) déterminée au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet.....	92
Tableau 13 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx), MDA et protéines carbonylées, au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet.....	93
Tableau 14: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité de l'acétylcholinestérase (nanomoles d'acétylcholine hydrolysée /minute/milligramme de protéine, déterminée au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet.....	101

Liste des abréviations

AGS: Acides gras saturés

AGMI: Acides gras monoinsaturés

AGPI: Acides gras polyinsaturés

ARfD: Acute Reference Dose

As: Arsenic

BHE: Barrière Hémato-encéphalique

BMDL: Benchmark doses lower confidence limits

CAT: Ctalase

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane

DHA: Acide docosahexaénoïque

DHTP: Dose hebdomadaire tolérable provisoire

DJA: dose journalière admissible

DJT: dose journalière tolérable

EAR: Estimated Average Requirement

EFSA: European Food Safety Authority

ERO: Espèces reactive d'oxygène

EPA: acide eicosapentaénoïque

FAO: Food and Agriculture Organization (of the United Nations)

GPx: Glutathion peroxidase

GST: Glutathione-S-transférase

J: Jour

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

Kg: Kilogramme

l: litre

LOAEL: Lowest-observed-adverse-effect level

MeHg: Méthylmercure

MRL: Minimal risk level

Mn: Manganèse

m³: mètre cube

ng: nanogramme

NOAEL: No-observed-adverse-effect level

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

p.c: poids corporelle

Pb: Plomb

PCB: Biphényles polychlorés

PE : Perturbateurs endocriniens

POP: polluants organiques persistants

PNNS : Programme National Nutrition-Santé

PTWI: Provisional Tolerable Weekly Intake

SCF: Scientific Committee for Food

SN: Système Nerveux

SNC: Système Nerveux Central

SNP: Système Nerveux Périphérique

Liste des abréviations

SOD : Superoxyde dismutase

RBC: Red Blood Cell

RDA: Recommended Dietary Allowance

RfD: Dose de référence

TDS: Total diet studie

UE: Union Européenne

µm: Micromètre

Introduction

1. Etat de l'art

Depuis plusieurs décennies les activités humaines ont anthropisé tous les milieux environnementaux et notamment les milieux aquatiques, qui sont les réceptacles de nombreuses substances chimiques médicamenteuses ou environnementales. Surtout que, le 20^{ème} siècle a vu l'avènement de la chimie de synthèse. Ainsi et bien que présentant de nombreux avantages, l'utilisation de ces nouvelles molécules a eu pour conséquence une pollution globale de l'environnement.

Parmi les polluants, omniprésents dans l'environnement, les polluants organiques persistants (POP), qui ont depuis plusieurs années attiré l'attention en raison de leur forte présence dans tous les maillons de la chaîne alimentaire. Ce sont des substances toxiques caractérisées par leur persistance, leur aptitude à subir un transport à longues distances par l'air, l'eau et par les espèces migratrices. En raison de leur longue demi-vie biologique, ces produits chimiques, sont bioaccumulables chez le même individu comme ils sont biomplifiables à travers les niveaux trophiques (Martin et Alwyn, 2013). Les POP entrent dans la chaîne alimentaire par différentes voies, telle que le dépôt sur les végétaux, l'ingestion par les animaux au pâturage, ainsi ils se concentrent dans les organismes occupant le sommet de la chaîne alimentaire tel que l'Homme. Ce dernier est fortement exposé aux POP, par la consommation d'aliments contaminés, essentiellement d'origine animale.

La sécurité des aliments est devenu une préoccupation majeure qui a conduit les autorités à évaluer leur qualité afin de réglementer la gestion des substances chimiques susceptibles d'y être introduites (La Merrill et Birnbaum, 2011; Martin et Alwyn, 2013). Dans ce cadre et depuis 1956, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO*) et l'organisation mondiale de la santé (OMS) ont administré conjointement un comité mixte FAO/OMS d'experts scientifiques internationaux (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA*). Au début de son activité, ce comité a concentré son travail sur l'évaluation de la sécurité des additifs alimentaires, par la suite, il s'est intéressé également à l'évaluation des contaminants chimiques, des composés toxiques naturels et les résidus des produits vétérinaires présents dans les aliments. Le comité a évalué plus de 1500 composés, dont 40 contaminants et 90 résidus de médicaments vétérinaires (*FAO Joint Secretariat to JECFA, 2013*). A l'échelle Européenne, en Janvier 2002, il y a eu la création d'un organisme

indépendant «autorité européenne de sécurité des aliments» (*European Food Safety Authority*, EFSA). L'EFSA travaille en étroite collaboration avec de nombreuses agences scientifiques et institutions des états membres de l'union européenne (UE). Elle fournit, en toute indépendance, des conseils scientifiques sur toutes les matières ayant un rapport direct ou indirect avec la sécurité alimentaire. Elle couvre tous les niveaux de la production alimentaire, de la production primaire à la livraison au consommateur. L'EFSA prend également en charge l'évaluation des risques au sein de la chaîne alimentaire et l'évaluation scientifique de toutes les matières en rapport avec l'alimentation. L'avis de l'EFSA est utilisé par la commission Européenne, les états membres et le parlement Européen (gestionnaires de risques), qui prennent des décisions pour l'élaboration d'une législation adaptée sur la sécurité sanitaire des aliments.

Selon l'OMS un résidu ou un contaminant est toute substance chimique quelconque qui persiste dans un milieu donné, à faibles concentrations après qu'elle-même ou d'autres composés lui donnant naissance aient été introduits, volontairement ou non, dans le dit milieu, et dont la présence est de ce fait qualitativement anormale. Néanmoins, il est possible de faire une distinction entre résidus et contaminants dans une denrée alimentaire. En effet un résidu provient de l'administration intentionnelle d'une substance à un végétal ou à un animal. Cependant un contaminant résulte de la présence non intentionnelle d'une substance dans un aliment (CIV, 2008).

2. Problématique

Le concept de l'approche bénéfice/risque lié à l'alimentation est apparu vers les années 2000, (WHO, 1997 ; WHO, 2006; EFSA, 2006; Sirot et *al.*, 2011; EFSA, 2015). Plusieurs aliments tels que le poisson constituent une partie intégrante de la culture traditionnelle dans de nombreuses populations comme pour les esquimaux. Il est estimé par la FAO qu'environ un milliard de personnes dépendent du poisson comme principale source de protéines (EFSA, 2005). En outre le poisson est considéré comme une source majeure en nutriments (acides gras mono- et polyinsaturés y compris les oméga 3, vitamines liposolubles, protéines, sélénium, calcium...) indispensables au fonctionnement physiologique « normal » de l'organisme (Rodier, 1991; Roegge et *al.*, 2006). Pour ce fait de nombreux organismes ont recommandé la consommation du poisson à raison de 2 fois par semaine soit 227g de poisson/semaine (Kris-Etherton et *al.*, 2002). Néanmoins des données toxicologiques suggèrent, que le poisson, notamment les espèces prédatrices, constituent un vecteur de transfert des contaminants, y inclus les POP tels que les biphényles polychlorés (PCB), vers

l'Homme. (Tilson et *al.*, 1990; Roegge et *al.*, 2006; Cocco et *al.*, 2011). Par exemple il a été rapporté que 95% de l'exposition humaine aux PCB se produit, principalement, par l'alimentation (Liem et *al.*, 2000) et que le poisson gras constitue le principale vecteur alimentaire (67%) des PCB vers l'Homme, en raison de 67% (EFSA, 2005; Bergkvist et *al.*, 2012). En outre une analyse détaillée de la contribution des différents aliments dans l'apport par voie d'ingestion en PCB-NDL, chez l'Homme, a révélé que les produits de la mer contribuent par 38% chez les enfants, 42% chez les femmes en âge de procréer et 42% chez les adultes (Arnich et *al.*, 2009).

L'anguille «*Anguilla anguilla* L.» est l'une des espèces connues par son haut degré de contamination par les PCB et les métaux lourds (ATSDR, 2000 ; Arnich et *al.*, 2009). Cette espèce constitue l'ingrédient principal de nombreux plats populaires tels que le kabayaki ou l'anguille fumée consommés dans plusieurs pays européens, asiatiques et nord-américains (Tsukamoto et Kuroki., 2014). Ainsi, l'anguille pourrait être définie comme un aliment «vecteur» du transfert des contaminants vers l'Homme et sa consommation constitue un risque toxique qu'il devient nécessaire d'évaluer.

En effet, de nombreuses études ont démontré que les polluants détectés dans le muscle de l'anguille tels que les métaux lourds et les PCB ont été identifiés, dans les liquides biologiques humains, tels que le lait maternel et le sang, chez certaines populations connues par leurs consommation fréquentes de cette ou d'autres espèces de poissons contaminés (Harrad et *al.*, 1999; Orloff et *al.*, 2003 ; Maes et *al.*, 2007; Ennaceur et *al.*, 2008, EFSA, 2010; Ferrante et *al.*, 2010; Tapie et *al.*, 2011; Bjemo et *al.*, 2013; Abdallah et *al.* 2014; Blanchet Letrouve et *al.*, 2014; Quinete et *al.*, 2014; Malarvannan et *al.*, 2014; Szlinder-Richert et *al.*, 2014 ; Wohlfahrt-Veje et *al.*, 2014).

3. Hypothèse

Des études épidémiologiques ont révélé que les troubles du développement neurocomportemental tels que l'autisme, le déficit de l'attention / hyperactivité (TDAH) et la dyslexie affectent de plus en plus d'enfants à travers le monde: 10-15% des naissances (Bloom et *al.*, 2010; Grandjean et *al.*, 2014). D'autres études ont aussi montré que les fœtus puis les nouveaux nés sont exposés aux POP, en particulier pendant la gestation et l'allaitement (Jacobson et *al.*, 1996; Ennaceur et *al.*, 2008; Wohlfahrt-Veje et *al.*, 2014). Etant donné que leur système de détoxification est encore immature, cela les rend plus sensibles aux risques neurotoxiques induits par ces xénobiotiques (Werbof et *al.*, 1963). Ainsi, une exposition précoce aux POP pourrait provoquer des déficiences persistantes chez l'individu lors de son développement, ou des atteintes dans les

fonctions comportementales et cognitives. Il est également supposé que ces déficiences puissent survenir durant des périodes tardives avec des risques neurotoxiques (Bouayed *et al.*, 2009; Elnar *et al.*, 2012).

Notre hypothèse serait que l'ingestion de certaines espèces de poisson contaminés tel que l'anguille, durant la période gestation et d'allaitement, présenterait un risque neurotoxique à court et/ou à long terme en impactant le développement du cerveau.

4. Objectifs

L'objectif principal de ces travaux est d'évaluer, expérimentalement, les risques neurotoxiques de l'exposition gestationnelle et lactationnelle, chez un modèle murin, par la voie d'ingestion, d'un poisson de type anguille « *Anguilla anguilla* » contaminé par une mixture de contaminants, dont les PCB, sur le comportement, le développement et la cognition.

Plusieurs approches ont été envisagées

- Evaluer, à partir d'une matrice poisson contaminé, pêché dans deux endroits, la concentration de certains POP et composés neurotoxiques,
- Evaluer le comportement de locomotion, d'activité générale, de désespoir, chez les souris, dont les mères ont été exposées durant la période gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées,
- Evaluer la capacité d'apprentissage et de mémorisation chez les souris de génération F1, dont les mamans ont été exposées durant les périodes de gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées par une mixture de polluants dont les PCB,
- Evaluer certains marqueurs du stress oxydant, et l'activité de l'acétylcholinestérase, dans trois régions cérébrales (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet), afin de déterminer la sensibilité particulière des différentes zones du cerveau, impliquées dans diverses fonctions étudiées.

Synthèse Bibliographique

I. Le système nerveux chez les vertébrés

Le système nerveux (SN) est spécialisé dans la conduction, la transmission et le traitement des informations. Chez les vertébrés, d'un point de vue anatomique on distingue, le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est constitué, de haut en bas, par l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) protégé par le crâne et la moelle épinière protégée par la colonne vertébrale. Le SNP est en parfaite continuité avec le SNC, il comprend le système nerveux somatique, qui gère les fonctions volontaires et le système nerveux autonome, qui gère les fonctions végétatives.

1. Les éléments cellulaires du système nerveux

1.1. Le neurone

Les neurones sont des cellules nerveuses hautement différenciées, anatomiquement et physiologiquement spécialisées dans la communication intercellulaire. Ils reçoivent, traitent et transmettent des informations codées sous la forme de messages chimiques ou électriques. Chacun d'entre eux est intégré dans des réseaux multiples, ordonnés et hiérarchisés chargés de recevoir ou transmettre un signal ou de coordonner une fonction complexe. La transmission nerveuse se fait par l'intermédiaire de plusieurs neurones qui sont en rapport les uns avec les autres par leurs dendrites ou par l'articulation d'un axone avec les dendrites d'une ou de plusieurs cellules voisines. La jonction entre les éléments de deux cellules constitue une synapse.

1.2. Les cellules gliales

Le tissu de soutien du système nerveux est formé par les cellules gliales. Elles assurent le lien avec les vaisseaux sanguins et apportent les nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du système nerveux. Plusieurs types de cellules gliales peuvent être distingués: les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules microgliales et les cellules épendymaires. Il existe plusieurs catégories de cellules gliales selon leur position anatomique:

1.2.1. Les cellules gliales du système nerveux central

1.2.1. 1. Les astrocytes

Les techniques histologiques classiques ont permis de diviser les astrocytes en deux classes:

- **classe de type 1:** Elle est composée de cellules protoplasmiques qui sont localisées dans la substance grise du système nerveux central. Leur corps cellulaire a un diamètre de 20 à 40 μm ; il en part de nombreuses expansions radiales, couvertes de varicosités. Les prolongements peuvent se terminer sur des capillaires sanguins, formant ainsi «les pieds vasculaires».
- **Classe de type 2:** Elle est composée d'astrocytes fibrillaires qui sont localisés dans la substance blanche, leur corps cellulaire est de 20 μm de diamètre. Leurs prolongements sont longs et fins, très peu ramifiés et rectilignes.

Une des caractéristiques essentielles des astrocytes est la formation d'une glie, limitant autour de chaque vaisseau du système nerveux central et sur toute la surface du cerveau. Cette glie est constituée de pieds astrocytaires plus ou moins larges, formant une lame basale du côté des cellules endothéliales ou des cellules de la pie mère. Ils constituent, ainsi, une frontière vis à vis des vaisseaux sanguins et des méninges. Ils forment également une frontière entre le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Ces cellules interviennent aussi dans le maintien de l'intégrité du système nerveux central en formant avec des cellules endothéliales la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Dans des situations non physiologiques, les astrocytes ont également un rôle de neuroprotection et de détoxification. Elles sont capables de capter les toxiques, et plus particulièrement les métaux, par des récepteurs spécialisés, les métallothioneins, et de les accumuler pour éviter une atteinte neuronale.

1.2.1.2. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes forment la myéline. La myéline joue un rôle nutritif et sert d'isolant électrique pour l'influx nerveux, augmentant la vitesse de conduction du potentiel d'action. Les oligodendrocytes sont localisés dans la substance blanche entre les fibres nerveuses (oligodendrocytes interfasciculaires) et dans la substance grise en association étroite soit avec les faisceaux de fibre myélinisées soit avec les corps cellulaires des neurones (Edgar et Sibille, 2012). Le rôle majeur des oligodendrocytes est donc de former et maintenir la myéline du SNC. Un oligodendrocyte peut myéliniser jusqu'à 60 axones (Edgar et Sibille, 2012).

De nombreuses études ont démontré que les modifications ou les altérations, qui touchent les oligodendrocytes, pourraient causer plusieurs maladies telles que l'hyperactivité, l'autisme, la dépression, l'alzheimer et la schizophrénie (Aston et *al.*, 2004; Aston et *al.*, 2005).

1.2.1.3. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du SNC. Elles possèdent la propriété de s'activer rapidement en réponse à des changements pathologiques dans le SNC. Cette activation est une étape clé dans la défense du parenchyme neuronal contre les maladies infectieuses, une inflammation, un traumatisme, une ischémie, une tumeur cérébrale ou une dégénérescence. Les cellules microgliales ont surtout un rôle de phagocytose, mais elles peuvent également avoir d'autres fonctions dans la réparation des tissus et dans la régénération neuronale. Elles peuvent détruire les micro-organismes envahisseurs et induire la cicatrisation en sécrétant des facteurs de croissance.

1.2.2. Les cellules gliales du système nerveux périphérique

1.2.2.1. Les cellules satellites

Les cellules satellites ont une fonction analogue aux astrocytes. Elles entourent les neurones sensoriels et autonomes (Ferry et *al.*, 2012).

1.2.2.2. Les cellules de Schwann

Elles assurent comme les oligodendrocytes, la myélinisation, des axones. Cependant, au contraire des oligodendrocytes, les cellules de Schwann forment la gaine de myéline autour d'un seul axone (Ferry et *al.*, 2012).

2. Développement du système nerveux

2.1. Mise en place des grandes structures nerveuses

Chez l'espèce humaine, le blastocyste, petite sphère creuse formée d'une centaine de cellules issues de la division de l'œuf, s'implante dans la paroi utérine le 6^{ème} jour après la fécondation. C'est à partir d'un épaissement d'une petite portion de la paroi interne du blastocyste que l'embryon va se développer. Son architecture, comme chez tous les vertébrés, est déterminée par le processus de gastrulation, c'est-à-dire par l'invagination de cellules externes aboutissant à la formation d'un embryon à trois feuillets. A partir de la masse homogène des cellules du blastocyste deux couches distinctes vont se différencier: l'ectoderme ou feuillet externe, et l'endoderme ou feuillet interne. Un troisième feuillet intermédiaire, le mésoderme, apparaît.

Au sein du mésoderme un ensemble de cellules, situées sur la ligne médiane sur toute la longueur de l'embryon, s'individualise en une corde dorsale qui enverra un signal induisant la

neurulation, c'est-à-dire la transformation d'une partie des cellules ectodermiques sous-jacentes en neuroectoderme destiné à donner le système nerveux.

Les mécanismes de la formation du tube neural paraissent très semblables chez la plupart des vertébrés, et la neurulation se déroule en quatre stades distincts qui se chevauchent dans le temps et l'espace (figure 1) (Smith et *al.*, 1997).

-L'ectoderme induit à la face dorsale de l'embryon s'épaissit et se différencie en une plaque neurale.

-La plaque neurale s'allonge et se rétrécit par des phénomènes de modelage.

-Une modification de la forme des cellules de la région médiodorsale, associée à des forces extrinsèques exercées par l'ectoderme, provoque une incurvation de la plaque neurale qui se creuse en une gouttière dont les bords latéraux se rapprochent et fusionnent sur la ligne médiane, dans la future région du myélocéphale caudal chez l'Homme.

-Enfin, la fusion progressant de part et d'autre à la manière d'une fermeture éclair, il se forme un tube neural creux, ouvert aux deux extrémités, mais ces deux ouvertures, appelées neuropores, se referment au cours de la quatrième semaine (au 24^{ème} jour pour le neuropore antérieur et au 26^{ème} jour pour le neuropore postérieur). La non fermeture du neuropore antérieur entraîne l'anencéphalie, mortelle en quelques jours après la naissance chez l'Homme, tandis que l'absence partielle de fermeture du neuropore postérieur se traduit par l'apparition d'une spina bifida.

En se séparant de l'ectoderme, le tube neural isole les cellules des crêtes neurales groupées en deux bandes longitudinales en position dorsolatérale. Le tube neural donnera naissance au système nerveux central (encéphale et moelle épinière), les crêtes neurales au système nerveux périphérique somatique (nerfs et ganglions) et végétatif (systèmes sympathique et parasympathique). Une troisième source de tissu nerveux est constituée par les placodes sensorielles, au nombre de neuf à dix paires chez les vertébrés. Elles ont pour origine des épaissements ectodermiques dans la région céphalique, et donneront les ganglions centraux des nerfs crâniens et les organes sensoriels de la tête.

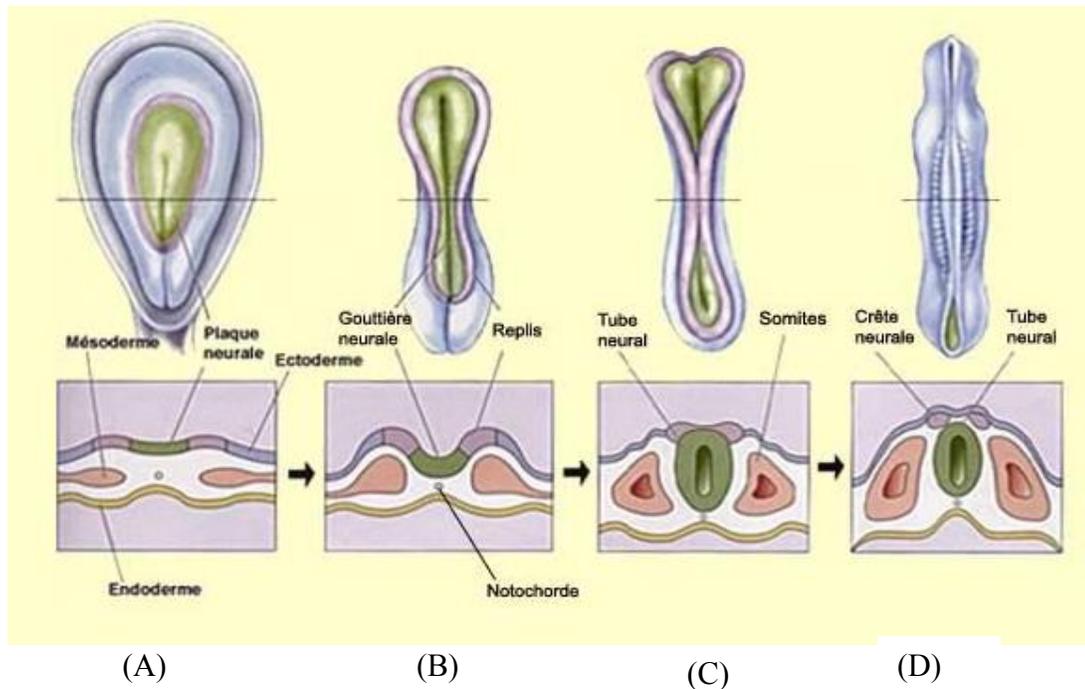


Figure 1: Etapes de mise en place du système nerveux

(A) : stade plaque neurale; (B) : Formation du sillon neural ; (C) : début de la fermeture du tube neural; (D) : fin de fermeture du tube neural.

2.2. Développement du cerveau

La multiplication des cellules neuroépithéliales entraîne la dilatation de l'extrémité antérieure du tube neural en une vésicule cérébrale primitive issue de la région antérieure élargie de la plaque neurale. Cette vésicule se divise très tôt en trois vésicules appelées prosencéphale (ou cerveau antérieur), mésencéphale (ou cerveau moyen) et rhombencéphale (ou cerveau postérieur), qui constituent l'ébauche du cerveau, tandis que la partie caudale reste grossièrement cylindrique et donnera la moelle épinière (figure 2).

Différenciation des vésicules primaires

➤ **Différenciation du prosencéphale** : Des diverticules apparaissent à la surface du prosencéphale: latéralement les deux vésicules optiques ainsi que les ébauches de la rétine et du nerf optique. En même temps, apparaissent la courbure cervicale et la courbure céphalique, dues à l'inflexion du tube neural. Au troisième mois. Le prosencéphale se partage en une vésicule antérieure ou télencéphale, comprenant une région moyenne et deux expansions latérales, les futurs hémisphères cérébraux, et une vésicule postérieure ou diencéphale.

Au niveau du télencéphale deux territoires distincts sont formés: le cortex cérébral et le télencéphale basal. Les bulbes olfactifs proviennent du bourgeonnement des nouvelles vésicules télencéphaliques. Les axones des neurones du télencéphale constituent progressivement le corps calleux, la substance blanche corticale et la capsule interne. Des structures comme les ganglions de la base ou l'amygdale font partie du télencéphale.

De même, le diencéphale se différencie en deux structures : le thalamus et l'hypothalamus. Le cerveau antérieur représente entre autre le siège de la perception, de la conscience, de la cognition, du mouvement volontaire.

- **Différenciation du mésencéphale :** Le mésencéphale ne subit que des modifications mineures lors du développement. Néanmoins, les fonctions du mésencéphale sont très variées. Il est impliqué notamment dans les systèmes sensoriels et le contrôle du mouvement. De plus, cette région contribue au passage de faisceaux de fibres très importants, reliant le cortex cérébral et la moelle épinière.
- **Différenciation du rhombencéphale:** Le cerveau postérieur se divise également en métencéphale, qui formera, par la suite, la protubérance annulaire et le cervelet, et en myélocéphale, futur bulbe rachidien, ces deux structures étant délimitées par la courbure pontique. Le cerveau postérieur constitue, comme le cerveau médian, une voie importante de l'information entre le cerveau antérieur et la moelle épinière. Les neurones du cerveau postérieur contribuent au traitement de l'information sensorielle, au contrôle du mouvement volontaire et à la régulation de l'activité du système nerveux autonome

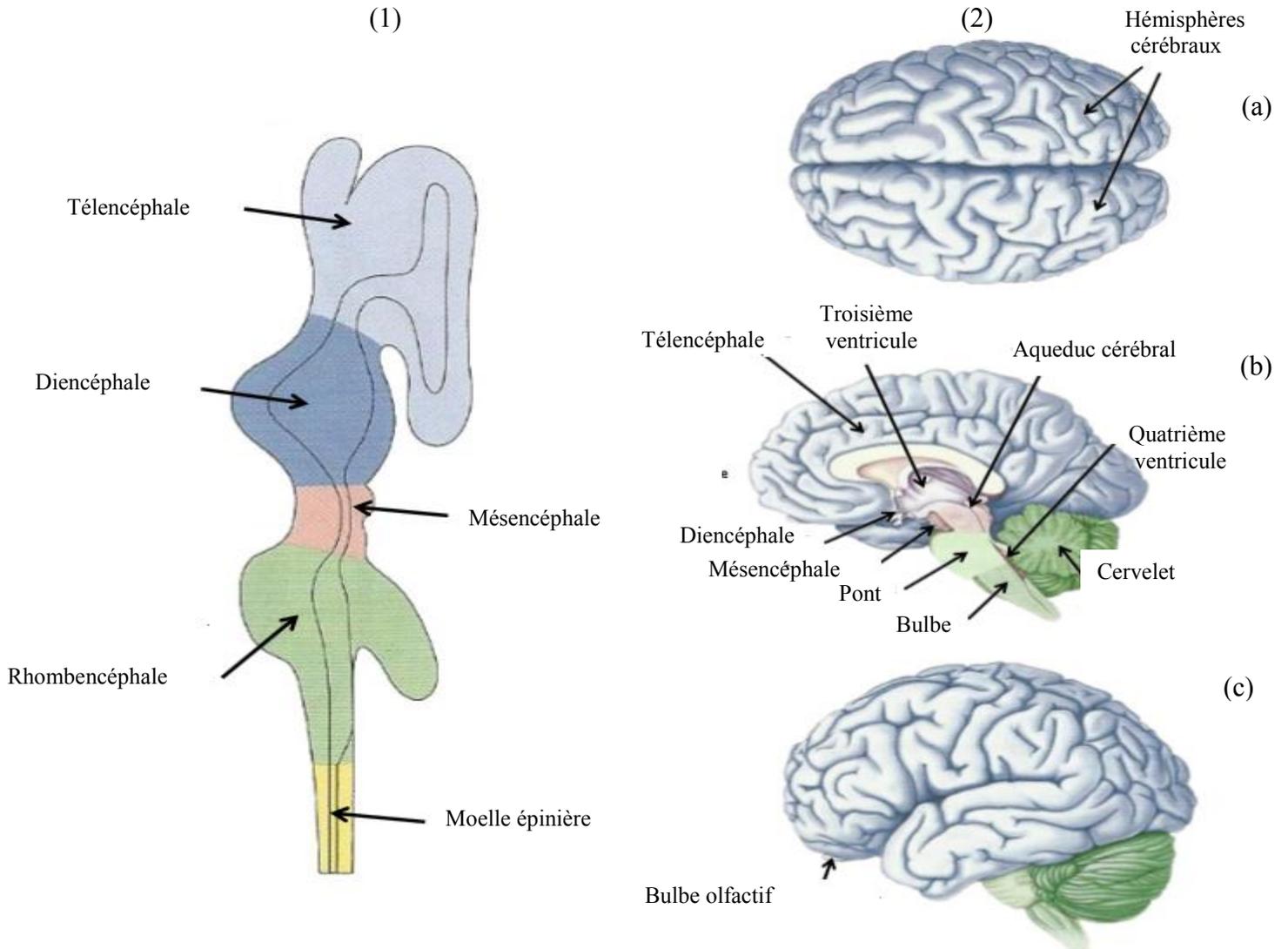


Figure 2: Evolution de la vésicule cérébrale primitive en cerveau (Bear et *al.*, 2010)

(1) : vésicule cérébrale primitive (2) : Organisation générale du cerveau (a) Vue dorsale (b) Vue médiosagittale (c) Vue latérale

II. Neurotoxicité développementale

Nous allons nous intéresser, dans cette partie, à la vulnérabilité du système nerveux central, particulièrement durant le stade de développement, à certaines substances chimiques dites «neurotoxiques», incriminées dans la perturbation de son développement et menant à l'altération, parfois, irréversible et persistante de ses structures et ses fonctions.

1. Définition

La neurotoxicité développementale est définie comme étant une altération de l'intégrité du système nerveux central, par le changement de sa structure, sa chimie ou ses fonctions suite à

l'exposition, durant la période précoce de son développement (prénatal et postnatal), à certains agents toxiques (chimiques, biologiques ou physique) (Dorman *et al.* 2001, EFSA, 2013(a)).

De nombreuses études incriminent des agents toxiques dans l'atteinte, des millions d'enfants, à travers le monde, par les troubles de neurodéveloppement tels l'autisme, le déficit d'attention, l'hyperactivité et la dyslexie (Grandjean et Landrigan., 2014). Ces troubles semblent affecter 10-15% de toutes les naissances dans le monde (Bloom *et al.*, 2010).

2. Principales causes de la neurotoxicité développementale

Les principales causes de l'épidémie mondiale actuelle «troubles du développement neurologique» ne sont que partiellement comprises. L'implication des facteurs génétiques dans ces maladies, ne dépasse guère 30 à 40%. Ainsi, les facteurs environnementaux, en interagissant avec les prédispositions génétiques héréditaires seraient impliqués chez certains sujet atteints par les troubles du développement neurologique (Grandjean et Landrigan, 2014).

Plusieurs études récentes ont démontré que les produits chimiques industriels, largement disséminés dans l'environnement, sont des contributeurs majeurs à la pandémie globale silencieuse de la toxicité neurodéveloppementale (Grandjean et Landrigan 2006). En effet le cerveau humain est très vulnérable aux xénobiotiques, surtout pendant la période de développement. Plusieurs processus neurodéveloppementaux tel que la prolifération, la migration, et la différenciation cellulaire contribuent à la formation des structures cérébrales, dans lesquels le nombre de cellules et leurs emplacement approprié est nécessaire pour le bon fonctionnement du cerveau (Semple *et al.* 2013). La perturbation des phénomènes de la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire par des xénobiotiques pourrait avoir de profonds effets délétères sur le cerveau en développement (Costa *et al.*, 2004) (figure 3).

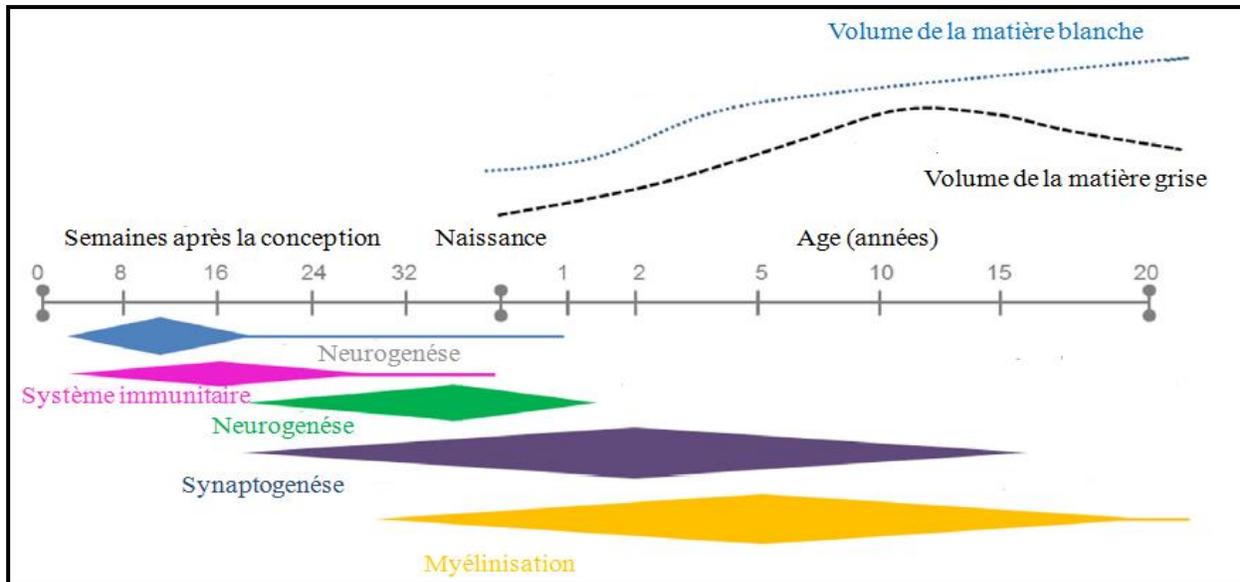


Figure 3: Présentation schématique des processus neurodéveloppementaux clés, chez l'humain, durant la gestation jusqu'à l'âge de 20 ans, en association avec l'évolution des volumes de la matière blanche et la matière grise, au cours du temps. (Semple et *al.* 2013)

Il est envisageable d'avoir des variabilités considérables dans le timing de développement des régions du cerveau.

Dans le système nerveux en développement, les neurotransmetteurs peuvent avoir d'autres fonctions que la neurotransmission, comme la modulation de la prolifération, et la différenciation cellulaire. Par ailleurs les neurotransmetteurs interagissent avec leurs récepteurs pour influencer la formation de l'architecture des différentes régions et des différents noyaux du cerveau (Nguyen et *al.* 2001). Ainsi, toute substance toxique qui interfère avec la neurotransmission au cours du développement peut causer des défauts permanents dans le SNC.

Plusieurs travaux ont rapporté que la densité neuronale du cerveau en développement est supérieure à celle du cerveau mature, ce qui fait que l'apoptose, intervient pendant la période de développement pour réguler cette densité (Giordano et Costa, 2012). Ainsi tout produit chimique interférant avec le processus apoptotique peut déclencher la dégénérescence des neurones, qui n'auraient pas dû être supprimés, comme il peut favoriser la survie des cellules qui auraient dues subir l'apoptose (Giordano et Costa, 2012). De plus de toutes ces considérations liées au développement des neurones, il est également évident que les cellules gliales (astrocytes,

oligodendrocytes et microglie) joueraient un rôle important dans le développement du cerveau et peuvent être la cible des xenobiotiques (Nguyen, 2001).

Le rôle de la barrière placentaire s'avère insuffisant pour empêcher le passage de nombreuses substances chimiques depuis l'organisme maternel vers l'organisme et le cerveau du fœtus. Durant la période d'allaitement, certaines substances lipophiles, surtout les POP, dont les pesticides et les composés industriels halogénés comme les PCB sont accumulés, dans le tissu adipeux maternel, et ensuite transmis aux fœtus et aux nouveaux nés. Plusieurs études ont montré qu'en se basant sur le poids corporel, l'exposition des nouveau nés, à ces substances chimiques, pourrait dépasser, d'un facteur de 100, l'exposition maternelle (Jensan et Slorach, 1991; Grandjean et Landrjgan, 2006).

.III. Les substances chimiques neurotoxiques

Le 20^{ème} siècle a vu l'avènement de la chimie de synthèse. Bien que présentant de nombreux avantages, l'utilisation des nouvelles molécules a eu pour conséquence une forte pollution de l'environnement, menant à une exposition croissante des individus. En effet les produits chimiques toxiques ont été reportés comme étant des contributeurs majeurs au retard neurodéveloppemental et aux maladies neurologiques touchant environ un enfant sur six aux États-Unis (Bloom et *al.*, 2010)

Aux Etats-Unis, 80 000 substances chimiques ont été enregistrées par l'agence américaine de protection de l'environnement (*United States Environmental Protection Agency*, US-EPA) pour l'usage commercial. En Europe la situation est similaire, 100 000 substances chimiques ont été enregistrées en 1981. Parmi ces produits seulement 1000 qui ont été testés et classés comme neurotoxique chez l'animale, dont environ 214 qui ont été classés neurotoxiques chez l'Homme. En 2006, Grandjean et Landrigan ont identifié cinq produits chimiques industriels toxiques pour le cerveau en développement: le plomb, le méthylmercure, les biphényles polychlorés, l'arsenic et le toluène. Depuis 2006 jusqu'à 2014, des études épidémiologiques ont mis en évidence six neurotoxiques supplémentaires pour le cerveau en développement : le manganèse, le fluorure, le chlorpyrifos, le dichlorodiphényltrichloroéthane, le tétrachloroéthylène, et les éthers diphényliques polybromés (Grandjean et Landrigan, 2014; Herbstman et *al.*, 2014). Ainsi, actuellement, à nos connaissances, le nombre de substances chimiques industriels toxiques pour le cerveau, en développement, s'élèverait à 11 produits (Figure 4).

Le travail de cette thèse est une étude des effets de la consommation des anguilles chimiquement contaminées durant la gestation et l'allaitement sur le neurodéveloppement des souris juvéniles. Etant donné que l'anguille est connue par son haut degré d'accumulation de polluants, nous nous attarderons au cours de ce chapitre sur sept polluants, neurotoxiques pour les organismes en développement et dont la majorité est fréquemment détectée dans les matrices alimentaires de type poisson: les biphényles polychlorés (PCB), le méthylmercure, le plomb, l'arsenic, le fluorure, le dichlorodiphényltrichloroéthane, le, les éthers diphenyliques polybromés.

De nombreux travaux ont montré que le poisson gras constitue le principale vecteur alimentaire (67%) des PCB vers l'Homme (EFSA, 2005; Bergkvist et al., 2012), c'est pour cette raison qu'une attention particulière sera attribuée aux PCB, qui sont utilisés lors de cette étude comme les principaux marqueurs de pollution des poissons.

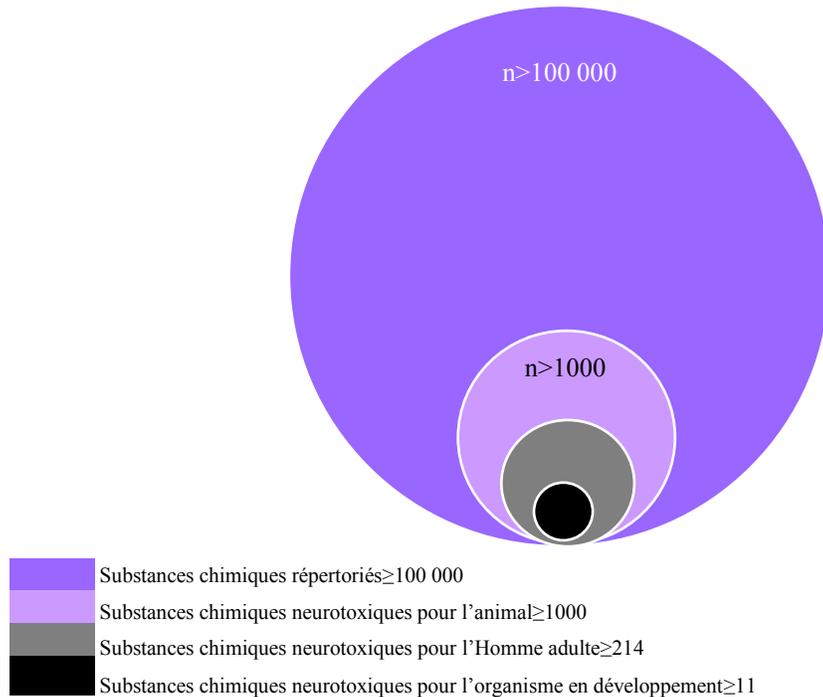


Figure 4: Proportion relative des substances chimiques dont l'action sur le développement cérébral est documentée en Europe (Grandjean et Landrigan, 2014)

1. Les biphényles polychlorés

1.1. Propriétés physicochimiques

Les biphényles polychlorés (PCB) sont des hydrocarbures halogénés de haut poids moléculaire, semi-volatils et hydrophobes. Ils sont des composés synthétiques qui sont caractérisés par leur grande stabilité thermique, chimique et biologique. Ils sont lipophiles et donc insolubles

dans l'eau. Leur lipophilicité augmente avec le degré de chloration et les congénères ayant un faible degré de chloration sont plus volatiles que ceux avec un degré de chloration plus élevé. Les congénères individuels de PCB sont incolores et cristallins mais les mixtures commerciales ne se cristallisent pas, même à faibles températures.

La formule chimique des PCB est $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, où $1 \leq n \leq 10$ (figure 5). Théoriquement, 209 congénères différents sont possibles, mais seulement 130 d'entre eux ont été identifiés dans des mixtures commerciales (Safe, 1990). Un système de numérotation pour les congénères de PCB a été adopté par l'union internationale de chimie pure (IUPAC) (Ballschmider et Zell, 1980). Ainsi, à chaque PCB est attribué un chiffre allant de 1 à 209, en fonction du degré croissant de substitution par les atomes de chlore et de la numérotation des atomes de carbone substitués.

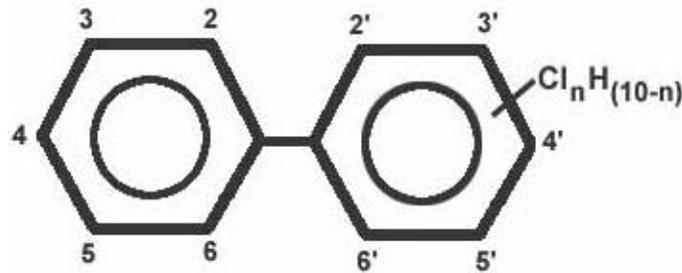


Figure 5: Structure chimique des PCB

Les 209 congénères de PCB sont classés en 2 groupes en se basant aussi bien sur leurs propriétés toxicologiques que chimiques (EFSA, 2005):

- Les dioxines PCB (PCB-DL): Ce groupe comporte 12 congénères, à savoir les PCB n° 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 et 189. Ils présentent des propriétés toxicologiques analogues à celles des dioxines du fait qu'ils sont capables de se lier au même récepteurs cellulaires aryl-hydrocarbure (AhR) et provoquer des effets toxiques similaires à ceux provoqués par les dioxines (EFSA, 2005).
- Les non dioxines PCB (PCB-NDL): Ce groupe comporte 197 congénères qui ont une structure non coplanaire et qui ont des propriétés toxicologiques différentes de celles des dioxines (EFSA, 2005). Ces congénères semblent agir avec différents modes d'action. Ils ont souvent des effets directs sur les cellules neuronales, tels que l'inhibition des neurotransmetteurs dopaminergiques ou l'interférence avec l'homéostasie du calcium (Brown et al., 1998)

Six congénères des PCB NDL (28, 52, 101, 138, 153, 180), sont généralement utilisés comme indicateurs d'une contamination aux PCB (tableau 1). Ce choix est basé d'une part sur leur

forte occurrence dans les matrices alimentaires, ainsi que sur la facilité de leurs détections. D'autre part, la Σ 6 PCB-NDL forme environ 50% des PCB totaux présents dans les matrices alimentaires (EFSA, 2005; Arnich et al, 2009). Les numéros accordés par l'Union Internationale de Chimie Pure (IUPAC) à chacun des 6 PCB-NDL sont reportés dans le tableau 1 :

Tableau 1: Numéros accordés par l'Union Internationale de Chimie Pure (IUPAC) à chacun des 6 PCB-NDL (OMS, 2000).

Numéro du congénère	Numéro IUPAC
PCB 28	2, 4,4' - Trichlorobiphenyl
PCB 52	2,2', 5,5' - Tetrachlorobiphenyl
PCB 101	2,2', 5,5' -Tetrachlorobiphenyl
PCB 138	2,2', 3, 4,4',5'-Hexachlorobiphenyl
PCB 153	2,2', 4,4', 5,5', Hexachlorobiphenyl
PCB180	2,2', 3, 4,4', 5,5'-Heptachlorobiphenyl

1.2. Applications

Les PCB ont été synthétisés pour la première fois en 1881 par Schmidt et Schultz en Allemagne (Maugh II, 1973). Leur faible coût de production, leur grande stabilité chimique ainsi que leur faible conductivité électrique ont rapidement suscité l'intérêt des industriels dès les années 1920. Ils ont été utilisés comme agent plastifiant dans des peintures, colles, encres, plastiques, ainsi que dans la fabrication de matériel électrique, d'échangeurs de chaleur et de systèmes hydrauliques et dans diverses autres applications spécialisées (INERIS, 2011 (a)). La production et l'utilisation des PCB sont devenues alors mondiales et intensives. Il est ainsi estimé que plus d'un million de tonne de PCB ont été produites dans le monde entier depuis 1929 jusqu'aux années 80 (EFSA, 2005; INERIS, 2011(a)). Le nom commercial des solutions de PCB varie avec le pays de fabrication et la société productrice (Tableau 2).

Tableau 2: Exemples des noms commerciaux de PCB selon leurs pays de production (Waid, 1986)

Nom commercial	Producteur	Pays de production
Arochlore®	Monsanto	Amérique
Clophen®	Bayer	Allemagne
Phenoclor®	Caffaro	Italie
Pyralène®	Prodelec	France
Kanechlor®	Kanegafuchi	Japon

1.3. Dispersion dans l'environnement

La longue période d'utilisation des PCB sans précautions particulières, leur susceptibilité d'être transporter sur de longues distances ainsi que leur faible biodégradabilité et leur caractère hydrophobe font que ces composés continuent à exister dans l'environnement. 21 000 tonnes de PCB seraient dispersées dans les sols de la planète (Meijer et *al.*, 2003), sans tenir compte des PCB sur les sols industriels et urbains, qui sont pourtant les plus exposés. Ils sont présents à tous les étages de la chaîne alimentaire (Borja et *al.*, 2005; Environnement-Canada, 1988). Ils s'accumulent dans les tissus adipeux et se concentrent en haut de la chaîne trophique.

Les PCB ont été classés, pour la première fois, parmi les polluants environnementaux par Jensen (1966). Depuis, plusieurs travaux ont révélé leur ubiquité, dans tous les compartiment de l'environnement (Schmid et *al.*, 2005; Salihoglu et Tasdemir, 2009; Orton et *al.*, 2011). Par ailleurs ces composés figurent sur la liste des polluants organiques persistants prioritaires établie par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (UNEP), lors de la Convention de Stockholm en 2004 et font l'objet de destruction (Décret n°2001-63 du 18 Janvier 2001).

1.4. Réglementation

Sur le plan international, un texte, édité en 2001, dans le cadre du programme des nations unies pour l'environnement (UNEP), fait figure de référence sur les polluants organiques persistants (POP) et donc sur les PCB, c'est la Convention de Stockholm. L'objet de ce traité est de limiter la pollution par les polluants organiques persistants (POP). Elle définit les substances concernées ainsi que les règles relatives à la production, l'importation et l'exportation de ces substances. La convention de Stockholm couvre 12 POP prioritaires qui sont produits intentionnellement ou non intentionnellement. La production non intentionnelle de ces substances provient de sources diverses, telles que la combustion domestique ou les incinérateurs de déchets. Ces 12 POP prioritaires sont l'aldrine, le chlordane, le dichlorodiphényltrichloréthane (DDT), le dieldrine, l'endrine, l'heptachlore, le mirex, le toxaphène, les polychlorobiphényles (PCB), l'hexachlorobenzène, les dioxines et les furanes. La convention vise à interdire la production et l'utilisation de 9 POP, y inclus les PCB à l'horizon 2025 (INERIS, 2011(a)).

1.5. Neurotoxicité

La principale voie d'exposition humaine aux PCB est la voie alimentaire. Elle contribue par plus que 90 % à l'exposition totale (OMS, 2004). Une étude réalisée par Arnich et ses collaborateurs (2009) a souligné que, la prise journalière moyenne en Σ 6 PCB-NDL par voie d'alimentation est de l'ordre de 12,9 ng/ kg pc/ j, pour les enfants, 7,6 et 7,7 ng/ kg p.c./ j respectivement pour les femmes en âge de procréer et les adultes.

Plusieurs études ont détecté les PCB dans les liquides biologiques humains telle que le plasma et le lait maternel dans différentes régions du monde (Ennaceur et *al.*, 2008, Quinette et *al.*, 2014; Frome et *al.*, 2015; Schettgen et *al.*, 2015). Plusieurs chercheurs, ont démontré les possibilités de transmission des PCB de la mère à son fœtus ou son nouveau née (Alivernini et *al.* 2011; Gómara et *al.*, 2011; Wohlfahrt-Veje et *al.*, 2014). En outre d'autres études ont montré les aspects présentant les effets délétères, que pourraient causer l'exposition aux PCB sur la santé humaine. Par ailleurs, deux catastrophes majeurs d'empoisonnement, appelées Yusho et Yu-cheng, ont eu lieu dans l'ouest du Japon en 1968 et le centre de Taiwan en 1979, respectivement. Ces événements ont été séparément causés par l'ingestion d'huiles de riz contaminés par les PCB. Les enfants taiwanais, nés de mères qui ont consommé l'huile de riz contaminé aux PCB, ont démontré un certain nombre d'anomalies développementales, y compris le poids, la taille, l'hyperactivité et le déficit de la fonction de mémoire (Schantz et *al.*, 2001).

Depuis les épisodes de Yusho et Yucheng (Japon), plusieurs études ont été lancées pour étudier les effets délétères de l'exposition précoce aux PCB sur la santé. Il a été démontré que l'exposition aux PCB, spécifiquement pendant le développement, est associée à une diminution des scores de quotient intellectuel (QI), troubles de l'apprentissage et de la mémoire, des difficultés psychomotrices et déficits de l'attention (Schantz et al., 2003; Stewart et al., 2008; Boucher et al., 2009, Colciago et al., 2009; Boix et al., 2010). Les annexes 1 et 2, résument les résultats issus de certaines études épidémiologiques et d'autres études réalisés chez les rongeurs, portant sur la neurotoxicité des PCB.

2. Le méthylmercure

2.1. Propriétés physicochimiques

Le mercure (Hg) est un métal présent naturellement à l'état de trace dans l'environnement. Il est un constituant de la croûte terrestre. A l'échelle planétaire, la moitié de cet élément métallique est d'origine anthropique. Le mercure (Hg) se présente sous forme d'un liquide argenté à la température ambiante (entre -10° et $+40^{\circ}\text{C}$) et il est extrêmement volatile sous sa forme élémentaire (Hg). En présence d'oxygène, le mercure s'oxyde très facilement passant de l'état métallique (Hg^0), liquide ou gazeux, à l'état ionisé (Hg^{2+}). C'est aussi un métal qui s'associe facilement aux molécules organiques formant de nombreux dérivés mercuriels y inclus le méthylmercure (MeHg). Les espèces organiques du mercure, sont généralement plus toxiques que les espèces inorganiques (INERIS, 2008).

La transformation du mercure (Hg^{2+}) en méthylmercure (MeHg) se déroule dans le milieu aquatique, par la microflore bactérienne marine, ce qui le rend biodisponible et explique sa forte capacité d'accumulation dans les coquillages et les poissons prédateurs en haut de la chaîne trophique. (COSSAD, 1999; INERIS, 2008).

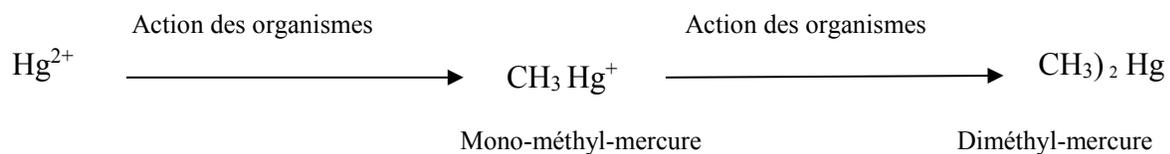
2.2. Synthèse et dispersion dans l'environnement

Le MeHg n'a pas d'usage industriel mais il provient de la méthylation du mercure inorganique dans les sédiments des milieux aquatiques (Harada et al., 1995).

À l'heure actuelle, on ne connaît pas les importantes sources anthropiques directes de méthylmercure. Cependant, les rejets anthropiques contribuent indirectement à la présence de MeHg dans l'environnement via la transformation d'autres formes d'Hg en MeHg. Néanmoins, le MeHg

Hg peut être libéré directement par les décharges municipales et par les stations d'épuration, mais l'importance globale de ces sources demeure encore incertaine (INERIS, 2008).

Le processus de méthylation est le processus le plus important qui entre dans le cycle du mercure au niveau des eaux et des sols. Il tient une part prépondérante en matière d'effets toxicologiques sur les animaux et les humains. Le méthylmercure ($\text{CH}_3 \text{Hg}^+$) est le résultat de la méthylation biologique ou chimique du mercure inorganique (Hg^{2+}), appelé substrat de méthylation (Thomassin et al, 2003). Le mercure est transformé en méthylmercure sous l'action de bactéries sulfato-réductrices, la réaction est optimale en milieu anoxiques; ainsi l'activité sulfato-réductrice et la concentration en sulfures libre vont avoir un rôle essentiel dans la méthylation du mercure.



Les principaux paramètres directeurs de cette réaction sont :

- La concentration en bactéries;
- Les quantités de sédiments et de matière en suspension;
- L'acidité du milieu, voir sa neutralité, favorisent la formation du méthylmercure alors qu'un milieu basique favorisera la formation de diméthylmercure.

2.4. Réglementation

En 1990, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) avait établi une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) à 3,3 μg de MeHg/kg p.c, en s'appuyant sur les évaluations du JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) de 1972 à 1989 (JECFA, 2004). Cependant, pour assurer une meilleure protection du fœtus et de l'enfant, l'OMS mettait en garde les femmes enceintes ou allaitantes.

Au cours de sa 61^{ème} session, du 10 au 19 juin 2003, le JECFA, dans le souci d'apporter une précaution supplémentaire vis à vis de l'impact potentiel du MeHg sur le développement neurologique du fœtus, a réévalué la DHTP pour le MeHg et l'a abaissé à 1,6 μg /kg p.c/semaine (Afssa, 2004).

En 2015, en se basant sur la neurotoxicité développementale du MeHg le groupe CONTAM a établi une dose hebdomadaire tolérable (DHT) de 1,3 μg / kg pc/semaine pour le Me Hg(EFSA, 2015).

2.5. Neurotoxicité

Selon l'OMS, 99% du MeHg absorbé quotidiennement par la population provient de l'alimentation (WHO, 1999). Chez l'Homme, la principale source d'exposition majeure au MeHg est le poisson (Decloître, 1998; JECFA, 2004)

Après son ingestion, le MeHg est rapidement absorbé le long du tractus digestif et 90% sont retrouvés dans le sang. Il passe ensuite la barrière hémato-encéphalique et se concentre essentiellement au niveau du système nerveux central. Le cerveau est en effet le principal organe cible du MeHg chez l'Homme et chez l'animal. La neurotoxicité de MeHg se manifeste à la fois sur le cerveau adulte mais plus encore sur le cerveau en développement. Le MeHg diffuse facilement à travers le placenta et passe dans le lait maternel. Il a été estimé que la vulnérabilité du système nerveux au MeHg, pendant la gestation, est cinq fois supérieure à celle du système nerveux adulte.

Plusieurs épisodes d'empoisonnement humain, à l'MeHg, ont eu lieu au fil du temps: La première preuve des effets délétères de l'exposition au Me Hg sur le cerveau en développement a émergé au milieu des années 1950 au Japon (Grandjean et *al.*,2011), où les enfants nés de mères vivants autour de la baie de Minamata (sud-ouest du Japon), qui consommaient du poisson contaminé au MeHg, présentaient de sévères déficits neurologiques, tandis que leurs mères ne semblaient pas être touchées (Harada, 1995). La deuxième, était en 1971 et 1972, en Irak, où la consommation accidentelle de pain fabriqué avec du blé traité avec un fongicide à base de méthylmercure a entraîné l'intoxication de 6000 personnes dont 500 sont décédés (Bakir et *al.*, 1973). L'interdiction de l'utilisation des fongicides à base de méthylmercure et le contrôle de la contamination des poissons a évité d'autres événements catastrophiques tel que ceux du Japon et de l'Irak. Cependant, la contamination des poissons, même, à de faibles niveaux continue, encore à exister et peut être responsable de la neurotoxicité développementale, en particulier dans les populations des forts consommateurs de poissons et des fruits de mer. Des résultats des études épidémiologiques ainsi que des données expérimentales sur des animaux ont fourni la preuve des effets indésirables du (MeHg), touchant en particulier la fonction locomotrice et les performances visuo-spaciales, chez les organismes en développement. Les annexes 3 et 4 présentent certains aspects de la neurotoxicité de Me Hg reportés par certaines études épidémiologiques et d'autres expérimentales réalisées sur des animaux.

3. Le Plomb

3.1. Propriétés physicochimiques

Le plomb est un métal mou, de couleur bleuâtre à gris- argent. Il fond à 327°C, il possède une forte densité et une ductilité élevée. A une température supérieure à 500°C, il est susceptible d'émettre des vapeurs et des poussières métalliques nocives. Par ailleurs la solubilité du plomb dans l'eau n'est pas négligeable et peut être à l'origine de la toxicité de certaines eaux de boisson (Viala et Botta, 2005).

3.2. Applications

Le plomb (Pb) est un métal lourd naturellement présent dans l'environnement terrestre et aquatique. Il est largement présent dans la croûte terrestre sous forme de minerais comme la galène (Pb S), la cérusite (Pb CO₃) et l'anglésite (Pb CO₄). La galène est de loin la première source de production de plomb, elle est souvent associée à d'autres minéraux, en particulier ceux contenant du zinc et du cadmium (Amirad, 2011).

Les batteries représentent une fraction importante des utilisations du plomb. Les batteries pour l'automobile représentent à elles seules 65 à 70% des utilisations du plomb dans le monde occidentale. Le reste de la consommation concerne des usages divers: radiateurs d'automobiles, munition, alliages, enrobage de câbles, soudure et céramique (Amirad, 2011).

3.3. Dispersion dans l'environnement

La production et l'utilisation du plomb ont augmenté de façon spectaculaire durant la révolution industrielle entraînant une libération intense de ce métal indestructible et son accumulation massive dans l'environnement. Depuis la fin du 19^{ème} siècle et jusqu'à une époque récente, l'utilisation des pigments au plomb dans les peintures constitue une source de dispersion importante. De plus, l'utilisation du plomb pour les canalisations du réseau de distribution publique de l'eau est une source non négligeable d'apport de plomb par ingestion d'eau contaminée. En outre l'introduction des alkyls de plomb dans l'essence, la diffusion de ce polluant non seulement autour des voiries des grands centres urbains, mais aussi à longue distance, est devenue un phénomène planétaire. L'accumulation massive dans les sols de ce métal indestructible et peu mobile, demeurant dans les couches superficielles où il reste très accessible au contact de l'Homme, surtout des enfants, représente une menace permanente pour la santé des populations.

3.4. Réglementation

Les risques pour la santé, liés à une exposition au plomb, ont été réévalués par l'EFSA et le JECFA en 2010. Ces deux instances ont conclu que la PTWI de 25 µg de plomb/kg p.c établi par comité scientifique des aliments «*Scientific Committee for Food*» (SCF) en 1992 n'était plus appropriée pour assurer la protection de la santé.

Le groupe CONTAM de l'EFSA a lié les teneurs de sang en Pb à la neurotoxicité développementale chez les enfants, et à des effets cardiovasculaires et néphrotoxiques chez les adultes. Il a déterminé des valeurs Benchmark Doses Lower Confidence Limits (BMDL), en se basant sur des concentrations en plomb dans le sang. Les valeurs BMDL les plus basses pour l'ingestion de plomb via l'alimentation, causant des effets indésirables ont été déterminées (EFSA, 2010). Elles sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3: Valeurs BMDL pour le plomb dans le sang et pour l'ingestion alimentaire déterminées par l'EFSA (2010) pour les effets cardiovasculaires, la néphrotoxicité et la neurotoxicité développementale.

Population	Effets toxiques du plomb	Valeur BMDL* pour le plomb dans le sang (µg/l)	Valeur BMDL* pour l'ingestion alimentaire (dérivés des valeurs BMDL* pour le plomb dans le sang) (µg/kg p.c/jour)
Adultes	Effets cardiovasculaires	26	1,5
Adultes	Néphrotoxicité	14	0,63
Enfants	Neurotoxicité développementale	12	0,5

* Benchmark Doses Lower

3.5. Neurotoxicité

L'exposition humaine au plomb peut se produire par voie alimentaire, l'eau, le sol, la poussière et l'air. Néanmoins dans l'Union Européenne (UE), la principale voie d'exposition de la population générale au plomb est la voie alimentaire (EFSA, 2010). Les composés organo-plomb, tels que le tri-alkyl-plomb et le tétra-plomb composés, sont plus toxiques que les formes inorganiques de Pb (US ATSDR, 2007, EFSA, 2010). Ils sont métabolisés en Pb inorganique aussi bien chez l'Homme que chez les animaux (IARC, 2006; EFSA, 2010). Pendant certaines périodes, particulières, comme la grossesse, l'allaitement et l'ostéoporose le Pb accumulé dans le corps, principalement dans le squelette peut être libérer, progressivement, de l'ossature, dans le flux sanguin. Le plomb peut, ainsi, être transférer de la mère au fœtus / bébé *in utero* et par le lait

maternel (EFSA, 2010). Le Pb affecte pratiquement tous les systèmes dans le corps, y compris le sang, le système cardiovasculaire, rénal, endocrinien, digestif, immunitaire et reproducteur.

En raison de sa longue demi-vie dans le corps, 30 jours dans le sang et entre 10 et 30 ans, dans les os, la toxicité chronique de plomb forme un risque potentiel pour la santé humaine. La cible la plus sensible à cet élément semble être le (SNC). Le Pb est un métal neurotoxique à la fois chez les adultes et chez les enfants: Chez les adultes, les principaux effets de l'empoisonnement par ce métal, sont une neuropathie périphérique, précisément myélinopathie, qui est réversible après chélation et arrêt de l'exposition. À des concentrations plus élevées (100 µg / dl dans le sang), une encéphalopathie peut également se développer. Dans les années 1970, le taux sanguin de 60 µg / ml de Pb était associé à des signes cliniques de toxicité chez l'adulte (EFSA, 2010).

Le développement du système nerveux central est extrêmement sensible aux effets de Pb. Même à très faibles taux sanguins, le Pb a le potentiel de perturber le développement cognitif et les performances intellectuelles des enfants (EFSA, 2010). En effet des études réalisées chez les animaux ont montré que l'exposition chronique à de faibles doses de plomb, en particulier pendant le développement, pourrait provoquer la neurotoxicité, en particulier les déficits dans l'apprentissage et le développement animal (Cory-Slechta, 2003; IARC, 2006 ; EFSA, 2010). En outre des études épidémiologiques ont lié la charge corporelle en Pb, chez les enfants, à des perturbations neurocomportementales et baisses du QI chez les sujets ayant des concentrations de sang, en Pb, même aussi faible que 2 µg / ml, (Canfield et *al.*, 2003; Lanphear et *al.*, 2005).

4. Le fluorure

4.1. Propriétés physicochimiques

L'ion fluorure (F⁻) est la forme ionique du fluor. C'est un halogène gazeux ayant une masse atomique de 18, 998 Da. On ne le trouve jamais sous cette forme dans la nature, car il est chimiquement très réactif et se combine avec tous les autres éléments à l'exception des gaz inertes. (Mackay et Mackay, 1989, EFSA, 2013 (b)).

4.2. Applications

Les substances chimiques, contenant du fluorure, ont de nombreuses applications. Le fluor est utilisé dans la fabrication de l'aluminium, l'acier, le verre, dans la poterie, dans la production de substances chimiques fluorées, dans la fonderie et dans le soudage et le brasage des métaux. Le fluorure de sodium est utilisé dans la préparation de divers pesticides, y compris les insecticides et

les produits de préservation du bois (Budavari, 1989). Les produits dentaires qui contiennent du fluorure sont très répandus ; ils comprennent les pâtes dentifrices, les suppléments, les bains de bouche et les gels et vernis appliqués par les spécialistes (Ripa, 1992).

4.3. Dispersion dans l'environnement

Les fluorures sont omniprésents dans l'air, l'eau et la lithosphère. Le fluor étant le plus électronégatif de tous les éléments, il ne se rencontre jamais à l'état libre dans la nature. Combiné chimiquement sous forme de fluorures, le fluor est par ordre de fréquence le dix-septième élément présent dans le sol et il constitue environ 0,06 à 0,09% de l'écorce terrestre. Dans les roches et les sols, les fluorures se rencontrent dans de très nombreux minéraux, dont la fluorine, la cryolithe, l'apatite, le mica, la hornblende et un certain nombre de pegmatites comme la topaze et la tourmaline. Les roches volcaniques et hypo-abyssales, de même que le gisement de sel d'origine marine en contiennent des quantités notables pouvant atteindre 2500 mg/kg. Les fluorures sont certes abondants à la surface du globe, mais il ne faut pas oublier que, souvent, ils sont solidement liés à certains minéraux ou autres composés chimiques et, par conséquent ne sont pas biodisponibles sous leur forme ionique (OMS, 2004).

Dans l'air, les fluorures sont présents sous forme de gaz ou de particules. Ils ont comme origine les sols, l'industrie, et surtout les volcans. Dans les zones non-industrielles, la teneur de l'air en fluorure varie entre 0,05 à 1,9 $\mu\text{g} / \text{m}^3$ (EFSA, 2013 (b)).

Dans les eaux de surface, le fluorure peut être naturellement présent à la suite d'un dépôt de particules provenant de l'atmosphère ou d'une altération des roches et des sols contenant du fluorure. Les eaux souterraines peuvent également contenir de fortes concentrations de fluorure en raison du lessivage des roches. Les usines de fabrication de produits chimiques et les étangs d'eaux résiduaires peuvent contribuer, directement par les effluents ou indirectement par volatilisation, à l'introduire du fluorure dans les sources d'eau (ATSDR, 1993)

4.4. Réglementation

➤ Les adultes

Les apports moyens de fluorure alimentaires des adultes variaient de 0,02 à 0,05 mg / kg p.c/jour. L'AI (adéquat intake) pour les Hommes a été fixée par l'IOM (1997) à 3,8 mg / jour et arrondi à 4 mg / jour, basé sur un poids de référence de 76 kg. Pour les femmes, l'AI a été fixé à

3,1 mg / jour et arrondi à 3 mg / jour sur la base d'un poids de 61 kilogrammes de référence (IOM, 1997).

D'autres institutions (DH, DA-CH) ont établi une valeur de 0,05 mg / kg p.c/ jour comme étant un (AI) en fluorure pour la protection des caries (DH, 1991; DA-CH, 2013).

➤ **Les nourrissons et les enfants**

L'AI fixé par Le COMA, (DH, 1991 ; EFSA ; 2013(b)), en fluorure, pour les nourrissons et les enfants, est de 0,05 mg / kg p.c/ jour.

4.5. Neurotoxicité

L'exposition modérée au fluorure a des effets bénéfiques sur la santé humaine y compris celle des dents. Cependant de nombreux travaux de recherche ont indiqué que les concentrations élevées de fluorure peuvent être source de préoccupations majeures sur la santé humaine. En effet l'excès de cet élément peut provoquer des affections qui vont d'une fluorose dentaire bénigne à une fluorose osseuse invalidante (WHO, 2006(a)). En outre des travaux de recherche récents ont classé le fluorure parmi les produits neurotoxique pendant le neurodéveloppement Grandjean et Landrigan (2014). Plusieurs études épidémiologiques ont établies des associations entre l'exposition des enfants, à de fortes concentrations de fluorure et la diminution de leurs QI (Ren et al., 1989; Li et al., 2009; Choi et al., 2012), et l'atteints par la maladie du déficit d'attention et l'hyperactivité (Malin et al., 2015).

5. Le dichlorodiphényltrichloroéthane

5.1. Propriétés physicochimiques

Le dichlorodiphényltrichloroéthane (C₁₄H₉C₁₅) est le nom commun de (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane), un pesticide de la famille chimique des organochlorés. Cette substance se présente sous forme d'un solide blanc et il est très peu soluble dans l'eau (1 µg/l), mais très soluble dans les solvants organiques (ATSDR, 2002). Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) technique est un mélange de différents isomères : 85 % de p,p'-DDT; 15 % de o,p'-DDT; traces de o,o'-DDT (ATSDR, 2002).

5.2. Synthèse et utilisation

Le DDT a été synthétisé pour la première fois en 1874, cependant ses propriétés insecticides n'ont été découvertes qu'en 1939 (Smith, 1991), et sa production industrielle, à grande échelle, n'a commencé en 1943. Il a été utilisé, pendant la seconde guerre mondiale, dans la lutte contre les insectes vecteurs de la malaria, et d'autres maladies. Au cours des années 60, environ 400 000

tonnes de DDT ont été utilisés annuellement dans le monde entier (70-80% a été utilisée pour l'agriculture) (IARC, 1974; Smith, 1991).

5.3. Dispersion dans l'environnement

En 1997, le DDT a été classé par le conseil d'administration du programme des Nations Unies pour l'environnement, parmi les polluants organiques persistants.

Suite à l'usage agricole du DDT, de fortes accumulations de cette substance ont été observées dans les centimètres supérieurs du sol, où il peut être sujet d'une faible évaporation et/ou à une photooxydation peu intense. De plus, le DDT peut subir une biodégradation si des populations de microorganismes spécifiques sont localement présentes (ATSDR, 2002).

Dans l'eau, le DDT a une forte tendance à s'adsorber sur des particules solides en suspension. Il s'accumule ainsi dans les sédiments et peut être transporté sur de longues distances dans les cours d'eau. Les sédiments contaminés peuvent donc constituer un stock de DDT à long terme (ATSDR, 2002). D'autre part, dans les eaux de surface, le DDT non associé à des particules a tendance à s'évaporer en quelques jours.

Dans l'atmosphère, le DDT peut se présenter sous forme de gaz, d'aérosol ou de particules fixées sur les poussières. Selon les Nations Unies (2002) le DDT et les produits résultants de sa décomposition sont semi-volatils et sont donc capables de se disperser dans l'atmosphère et de se condenser à basse température. En conséquence, on peut les trouver non seulement à proximité des sources d'émission connues, mais également à des niveaux de concentration notables, loin de ces sources. De plus le DDT adsorbé sur des poussières peut être transporté à des milliers de kilomètres de distance (ATSDR, 2002).

5.4. Réglementation

La production et l'usage du DDT sont soumis à la convention de Stockholm, datant du 22 Mai 2001, ayant pour but la protection de la santé humaine et l'environnement des polluants organiques persistants. Selon cette convention la production et l'utilisation de ce produit n'est autorisé que pour lutter contre les vecteurs de la malaria.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a défini une dose journalière admissible (DJA) en DDT de 0,02 mg/kg p.c., comme elle a fixé une limite maximale de la concentration de DDT dans l'eau potable de 2µg/l (OMS, 2002).

5.5. Neurotoxicité

Malgré que sa production et son utilisation ont été bannies dans la plupart des régions du monde, le DDT et ses produits de dégradation continuent à être détectés dans les liquides biologiques humains telle que le plasma, le lait maternel et le cordon ombilical (Ennaceur et Driss, 2010 ; Ben Hassine *et al.*, 2012 ; Bouwman *et al.*, 2012; Artacho-Cordón, *et al.*, 2015).

Le système nerveux est la cible la plus sensible, dans l'organisme humain, au DDT (ATSDR, 2002). En effet, cet insecticide agit par inhibition de la repolarisation neuronale. Les symptômes d'intoxication par ce produit se manifestent, en général, une paresthésie buccale, de l'irritabilité, des étourdissements, des vertiges, des tremblements et des convulsions. Chez les enfants en Caroline du nord les niveaux d'exposition à p 0-DDE, ne sont pas associés avec des troubles neurologiques ou anomalies de développement mental (Gladen et Rogan., 1991).

6. Les éthers diphényliques polybromés

6.1. Propriétés physicochimiques

Les éthers diphényliques polybromés (PBDE) forment une classe de composés organiques, aromatiques bromés. Ils ont comme structure de base de deux groupes phényles reliés par une liaison éther. Ces molécules sont représentées par la formule chimique: $C_{12}H_{(n-1)}Br_{(n)}$ où $n \leq 10$. Deux cent neuf congénères de PBDE sont possibles, selon le nombre et la disposition des atomes de brome sur les cycles benzéniques (EFSA, 2011) (figure 6).

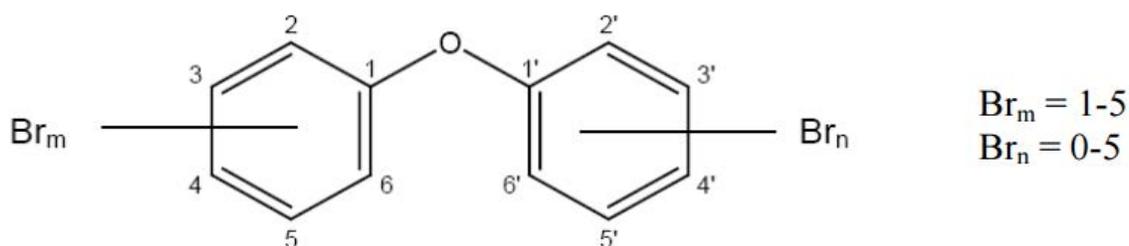


Figure 6: Structure générale des congénères des éthers diphényliques polybromés (PBDE) (EFSA, 2011)

La stabilité chimique des PBDE varie avec la structure individuelle des congénères. Mais en général les congénères de PBDE ayant un nombre de substitution bromé variant de 4 à 8 sont

considérés comme étant les plus stables (Eriksson et *al.*, 2004; Christiansson et *al.*, 2009 ; EFSA, 2011).

6.2. Synthèse et utilisation

Les produits techniques de PBDE sont fabriqués par bromation de l'éther de diphenyle en présence d'un catalyseur de Friedel-Crafts dans un solvant. Les principaux produits techniques contiennent, essentiellement les penta BDEs, hepta BDEs ou déca BDEs, mais ils contiennent aussi d'autres congénères de PBDE (EFSA, 2011). Ils ont été largement utilisés en tant que retardateurs de flamme et incorporés dans les produits de consommation tels que les appareils électroniques, les ordinateurs, les téléviseurs, les matelas, les meubles, les plastiques et les textiles synthétiques, emballages en mousse de polyuréthane. (UNEP, 2007).

6.3. Dispersion dans l'environnement

Étant donné leur faible pression de vapeur, leur très faible solubilité dans l'eau et leur coefficient de partage élevé, les PBDE auront tendance à se lier à la fraction organique des matières particulaires, du sol et des sédiments. Les résultats de la modélisation par ordinateur indiquent que les PBDE se retrouveraient principalement dans les sédiments, puis dans les sols, l'eau et l'air, où ils peuvent faire l'objet d'un transport et d'un dépôt atmosphérique. (Gouin et Harner, 2003). Le déca BDE peut faire l'objet d'un transport et d'un dépôt atmosphérique, quoique dans une mesure moindre que les congénères comptant moins d'atomes de brome. Globalement, la présence des différents PBDE dans une phase organique ou dans le biote, ou les deux, dépend de leur degré de bromation.

6.4. Réglementations

La production et l'utilisation des PBDE sont interdites selon la convention de Stockholm. Certaines applications spéciales (avions militaires, combinaisons spatiales, etc.) pour lesquelles les substituts ne sont pas assez efficaces et/ou très coûteux ont pu bénéficier d'une dérogation pendant une période transitoire (UNEP, 2007).

6.5. Neurotoxicité

Suite à un programme de surveillance réalisé par le groupe CONTAM de l'EFSA, sur 3971 échantillons de denrées alimentaires, issues de 11 pays européens, huit congénères BDE ont été sélectionnés, BDE : 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 et 209 comme indicateur de l'exposition alimentaire aux PBDE, en se basant sur leur occurrence dans l'environnement ainsi que la composition des mélanges techniques de PBDE (EFSA, 2011). Selon les résultats de cette étude,

le poisson et les produits de la mer sont les aliments les plus contaminés en BDE 47 et 100, la viande est la plus contaminée en BDE-28, le lait et les produits laitier sont les plus contaminées en BDE-99, 153, 154, 183 alors que les graisses d'origine animale et végétale sont les plus contaminées en BDE-209 (EFSA, 2011).

Malgré que la teneur des PBDE, dans les différents compartiments de l'environnement, a diminué ces dernières années, suite à son inscription à la convention de Stockholm, ces derniers continuent à être détectés dans les liquides biologiques humains telle que le plasma, le lait maternel et le cordon ombilical (Ben Hassine et *al.*, 2012 ; John et *al.*, 2014 ; Stasinska et *al.*, 2014 ; Fromme et *al.*, 2015).

De nombreuses études épidémiologiques ainsi que d'autres réalisées sur les animaux ont montré que l'exposition aux PBDE peut être incriminé dans plusieurs maladies y inclus les maladies neurologiques telle que les perturbations de l'activité motrice (Rice et *al.*, 2007; Kuriyama et *al.*, 2004; Ta et *al.*, 2011; Chen et *al.*, 2014) et du niveau d'anxiété (Adgent et *al.*, 2014; Kuriyama et *al.*, 2004) ainsi que des troubles de mémoire et d'apprentissage (He et *al.*, 2009; Buratovic et *al.*, 2014; Chen et *al.*, 2014).

IV. Le concept de l'approche bénéfice/risque liée à l'alimentation

L'analyse risque/bénéfice peut être envisagée dès lors qu'un aliment ou un composant nutritionnel combine, à la fois, des effets potentiellement positifs et négatifs. Le risque a été défini par l'organisation mondiale de la santé (OMS/FAO), comme la probabilité d'apparition d'un effet néfaste dans un organisme, un système, une population ou un sous-groupe populationnel, en réaction à l'exposition à un agent. Alors que le bénéfice a été défini par l'EFSA (2006) comme étant la probabilité d'apparition d'un effet positif et/ou comme la probabilité de réduction d'un risque, dans un organisme, un système, une population ou un sous-groupe populationnel, en réaction à l'exposition à un agent (EFSA, 2006). Le fait de considérer, uniquement les risques du point de vue du toxicologue, ou les bénéfices du point de vue du nutritionniste, peut conduire à des recommandations contradictoires (Renwick et *al.*, 2004).

Selon l'EFSA (2006) l'évaluation des risques/ bénéfices des aliments est un processus purement scientifique qui nécessite une expertise en toxicologie, de la nutrition et de l'évaluation de l'exposition. Ci-dessous le résumé de l'approche d'évaluation par étapes du rapport bénéfices/risques liée à l'alimentation adoptée par l'EFSA (2006):

Le processus se déroule en quatre étapes principales:

1. L'identification du danger/ effet bénéfique sur la santé,
- 2-La caractérisation du bénéfice/risque en décrivant les effets bénéfiques/ nocifs de la substance, en se basant sur des études épidémiologiques (si elles sont disponibles) et d'autres réalisées sur l'animal. Cette étape se traduit souvent par la détermination d'une dose journalière tolérable (DJT) pour les substances toxiques et d'une dose journalière de référence (RDI) pour les nutriments,
3. L'évaluation de l'exposition, se fait par l'estimation de l'apport du composé étudié par la nourriture ou le risque présenté par les substances toxiques,
4. La caractérisation du bénéfice/risque, combine à la fois la caractérisation du bénéfice /risque et l'évaluation de l'exposition comme elle évalue qualitativement et quantitativement l'importance/la gravité du risque sur la santé.

Après la caractérisation des risques et des bénéfices, une étape de comparaison de l'un vis-à-vis de l'autre s'impose (figure 7).

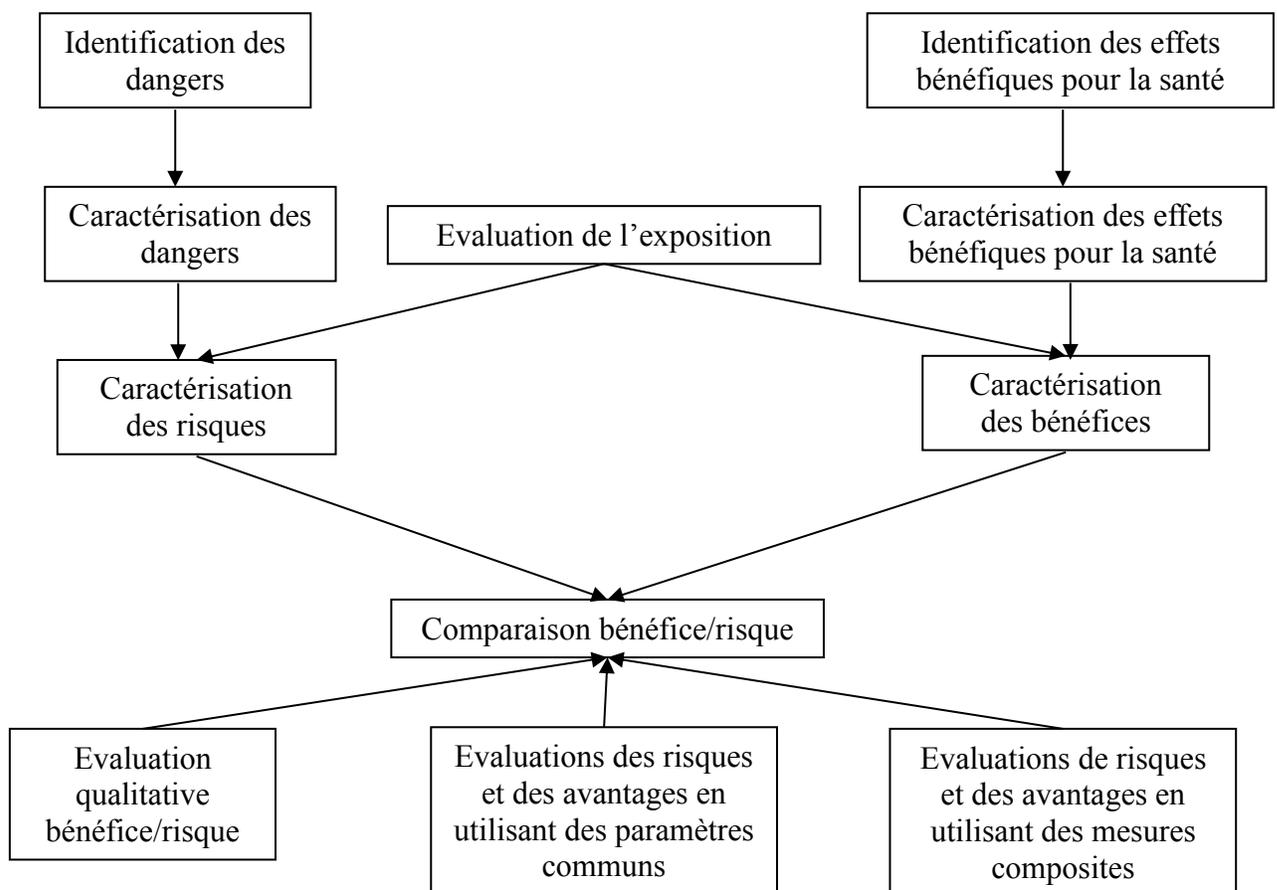


Figure 7 : Description schématique de l'approche l'EFSA pour l'évaluation du rapport bénéfices/risques des aliments (Barlow et *al.*, 2010).

V. Les bénéfices et les risques liés à la consommation du poisson

Les produits de la mer tels que les poissons, les mollusques et les crustacés sont depuis de nombreuses années mis sur le devant de la scène pour des considérations aussi bien d'ordre nutritionnel que toxicologique. Ces produits sont considérés par les nutritionnistes comme une source importante de protéines de bonne qualité, de minéraux et d'acides gras essentiels tels que l'oméga 3. Pour les toxicologues, les produits de la mer sont plutôt considérés comme des vecteurs de substances toxiques. La réalité scientifique est plus complexe et la frontière entre ces deux modes de pensée nécessite de prendre en considération la composition du produit aussi bien en substances nutritionnelles que toxiques d'une part, et le comportement du consommateur vis à vis de ces produits d'autre part.

1. Les bénéfices liés à la consommation du poisson

Le poisson représente une source importante de vitamines liposolubles, de protéines et également de micro- et macro-éléments tels que le sélénium, le zinc, le calcium, le phosphore et les acides gras mono- et polyinsaturés y compris les oméga-3. Ces nutriments sont essentiels pour les fonctions corporelles et sont bénéfiques pour la croissance, le cerveau et le système nerveux. Généralement les bienfaits de la consommation du poisson sur la santé humaine sont, essentiellement attribués à sa richesse en oméga-3 tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA), permettant la réduction du risque d'atteinte par les maladies cardiovasculaires, arthrites et d'autres maladies inflammatoires. En effet pendant le développement le DHA s'accumule dans le système nerveux central, c'est l'un des constituants majeurs des membranes neuronales et de la rétine (Crawford, 1993; Lauritzen et *al.*, 2001; Wainwright, 2002; Dangour, 2008)

L'insuffisance d'apport en DHA, pendant les périodes critiques du développement du cerveau a été associée à des troubles de comportement aussi bien chez l'animal que chez l'Homme. En effet le manque d'apport en DHA pendant le développement a été associé à un retard de la migration neuronale, une perturbation de l'arborisation dendritique, un développement neuronal anormal au niveau de l'hippocampe, et des anomalies apoptotiques (Salem et *al.*, 2001).

En effet environ 600 g d'acides gras, y compris le DHA sont transférés de la mère au fœtus, pendant la période de gestation (Dangour, 2008).

2. Les risques liés à la consommation du poisson

En dépit des effets bénéfiques, que présentent les nutriments du poisson, sa teneur en contaminants pourrait causer des problèmes pour la santé humaine. Ceci est particulièrement vrai pour les composés lipophiles et persistants qui s'accumulent, à travers la chaîne alimentaire, dans les espèces de poissons prédateurs (SCAN, 2004 ; EFSA, 2012(b)). Les concentrations des polluants tels que les PCB, le méthylmercure (MeHg) les dioxines, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et certains pesticides dans les poissons dépendent, de plusieurs facteurs, y compris leurs trajets de migration, leurs teneurs en matière grasse, leurs âges, le nombre de fois où ils se reproduisent, leurs tailles et leurs régimes alimentaires (SACN, 2004 ; Takaomi, 2013).

3. Modèle d'étude : l'anguille Européenne (*Anguilla anguilla* L.)

3.1. Classification

Le genre *anguilla* regroupe 15 espèces et 3 sub-espèces distribué dans le monde entier. Parmi ces espèces *Anguilla anguilla* (L.) qui a été décrite pour la première fois, en 1758 par Linnaeus. Elle est la seule espèce d'anguille représentée en Europe (Bertin, 1951). Sa classification taxonomique est la suivante:

Règne: *Animalia*

Embranchement: *Chordata*

Sous-embranchement: *Vertébrata*

Superclasse: *Ostéichthyes*

Classe: *Actinoptérygii*

Sous-classe: *Néoptérygii*

Ordre: *Anguilliformes*

Famille: *Anguillidae*

Genre: *Anguilla*

Espèce: *anguilla*

3.2. Cycle biologique

L'anguille Européenne, *Anguilla anguilla*, est un poisson migrateur. L'adaptation de cette espèce aux fortes variations de salinité, lui permet de se reproduire en milieu marin alors qu'elle passe la majorité de sa vie dans les eaux douces à saumâtres. Son cycle de vie peut durer jusqu'à 90 ans mais en général il a une moyenne de 10-15 ans (Tsukamoto et Kuroki., 2014). Son mode de vie et de reproduction particulier l'oblige donc à effectuer plusieurs migrations qui nécessitent des adaptations aussi bien physiologiques que morphologiques appelées métamorphoses. Le cycle

biologique de l'anguille Européenne est donc composé de deux phases de migrations accompagnées de deux phases de métamorphoses (figure : 8).

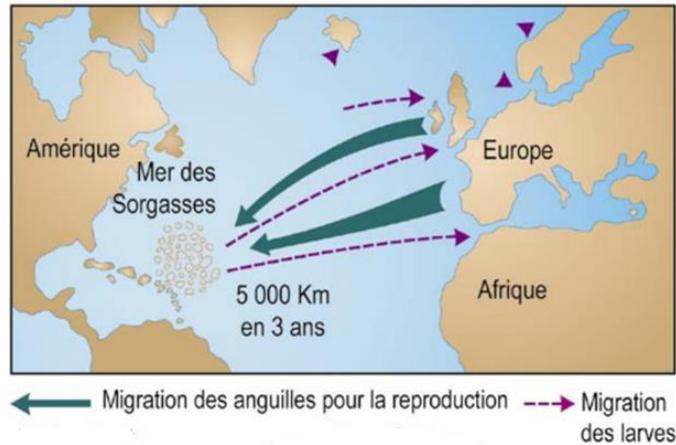


Figure 8 : Cycle de migration des anguilles

3.2.1. La phase de reproduction en mer des Sargasses

Le lieu présumé de reproduction de l'anguille Européenne a été situé par Schmidt en 1922, en mer des Sargasses (Figure 8). L'accouplement et l'éclosion des œufs en grande profondeur aboutissant à la naissance des larves leptocéphales.

3.2.2. Première migration: de la mer des Sargasses vers l'Europe et l'Afrique du nord

Après la ponte dans la mer des Sargasses, les larves transparentes, vermiformes et aplaties dites «leptocéphales» sont transportées par le Gulf Stream vers l'Europe et l'Afrique du nord où elles se métamorphosent en civelles en atteignant le plateau continental. Etant dotées de quelques dents, les larves leptocéphales se nourrissent de plancton. Celui-ci est de taille réduite (5 à 6 mm) au début de la migration, mais peut atteindre une taille de 75 à 80 mm aux abords des plateaux continentaux Européen et nord-Africain (Bertin, 1951; Elie, 1979; Tesch, 1982; McCleave et Kelckner, 1987). La durée de cette migration a été estimée à une période de 5 à 8 mois, mais reste très controversée (Arai et *al.*, 2000).

3.2.3. Première métamorphose: de la larve leptocéphale à la civelle

Une fois parvenues au niveau du talus continental, les larves leptocéphales se métamorphosent et deviennent des civelles transparentes (Figure 9). Cette métamorphose exige de grandes transformations d'ordre anatomique, morphologique et physiologique. Celles-ci se traduisent d'abord visuellement par la disparition des dents larvaires au profit de bourgeons dentaires et le passage d'une forme rubanée à une forme cylindrique plus petite (55 à 75 mm et 0,2 à 0,3 g), mais plus proche de celle des adultes. De plus, les nageoires rudimentaires de la larve

leptocéphale deviennent fonctionnelles et permettent une nage horizontale plus efficace. D'autre part, les appareils respiratoires et circulatoires se mettent en place et des branchies, le cœur et l'artère longitudinale vont ainsi apparaître. Les yeux aussi subissent une transformation, avec l'apparition de cellules en cônes leur conférant une meilleure vision diurne. Enfin, une régression considérable du tractus digestif est observée. L'œsophage, l'estomac et l'intestin sont ainsi très peu différenciés chez une jeune civelle et ne lui permettent plus de se nourrir (Elie, 1979; Tesch, 2003). Le futur appareil digestif du stade adulte se formera par la suite, ce qui explique en partie pourquoi la civelle est considérée comme un stade post-larvaire, intermédiaire entre la larve et l'adulte (Elie, 1979; Elie et *al.*, 1982).

A l'issue de cette métamorphose, entre le mois d'octobre et d'avril, les civelles qui se présentent à l'entrée d'un estuaire, se sédentarisent ou bien gagnent directement les compartiments fluviaux (eau douce) soumis à la marée (Elie et Rochard, 1994).

Au cours de leur migration en eau douce, les individus présentent alors une activité alimentaire marquée. Cette phase migratoire en eau douce se distingue également par une accentuation de la pigmentation. Cette dernière, qui commence dès la fin de la métamorphose larve-civelle, procède en deux étapes. Une pigmentation tout d'abord noire (mélanine) se développant sur la face dorsale des individus va venir se mélanger, dans un deuxième temps, à une trame de pigments de couleur jaune apparaissant sur la face ventrale (Elie, 1982). La métamorphose achevée, la civelle devient ainsi progressivement anguilette puis anguille jaune (figure 10) et adopte un mode de vie benthique et nocturne (Bertin, 1951; Tesch, 2003). La longue phase de croissance commence.



Figure 9: Photographie d'une anguille européenne, *Anguilla anguilla*, au stade civelle.
(Échelle non disponible)

Phase de croissance continentale: le stockage des réserves énergétiques

La phase de croissance de l'anguille européenne est très longue (4 à 20 ans pour les femelles et 2 à 15 ans pour les mâles) et a pour objectif la croissance mais aussi la différenciation sexuelle des individus. A ce stade, l'anguille dite jaune (Figure 10), c'est à dire ayant acquis une pigmentation complète, a généralement un comportement sédentaire et territorial (Bertin, 1951, Tesch, 2003). Son régime alimentaire est très varié, il est composé de petits crustacés (crabes, crevettes), d'annélides, de mollusques bivalves et de petits poissons pour la fraction de la population occupant les milieux saumâtres, et principalement de larves d'insectes et de poissons de petite taille pour les individus vivants en milieu d'eau douce. Ce régime alimentaire principalement carnivore, lui permet d'accumuler des réserves énergétiques importantes pour sa future migration. Ces réserves énergétiques sont principalement stockées sous formes de lipides et localisées au niveau des muscles et de la partie abdominale.

3.2.4. Deuxième métamorphose: du jaune à l'argenté

A ce stade, les anguilles femelles mesurent en moyenne 54 à 61 cm alors que les mâles atteignent seulement une longueur moyenne comprise entre 35 et 41 cm (Durif et *al.*, 2000; Tesch, 2003). Cette seconde métamorphose couramment nommée argenture «silvering» est marquée par de profondes modifications anatomo-physiologiques. Ainsi, on observe chez des individus en cours d'argenture :

- Une prolifération et une transformation des cellules à chlorure préparant le passage des individus d'un milieu hypo-osmotique (eau douce) à un milieu hyper-osmotique (eau de mer) (Fontaine et *al.*, 1995),
- Un épaissement de la peau et une prolifération des cellules à mucus supposées constituer une barrière aux entrées d'ions (Na⁺, Cl⁻) (Durif et *al.*, 2000),
- Une augmentation du diamètre et donc du volume de l'œil, couplé d'un changement des pigments rétinien accommodant les individus à une vision de lumière bleue caractéristique des grandes profondeurs (Archer et *al.*, 1995; Durif et *al.*, 2005),
- Une augmentation de la longueur des nageoires pectorales assurant une meilleure flottabilité (Durif et *al.*, 2005),
- Une augmentation du volume du muscle rouge mieux adapté à une activité de nage soutenue, l'anguille passant d'un mode de vie benthique à un mode de vie pélagique (Pankhurst, 1982),
- Un épaissement de la paroi de la vessie natatoire couplé à un développement accru du réseau de capillaires sanguins situé à sa surface (Kelckner et McCleave, 1980).

Les anguilles quittant les côtes européennes et nord africaines sont encore à un stade pré-pubère. Chez les femelles, les ovocytes sont en tout début de vitellogénèse et les mâles ne présentent que des spermatogonies. Cette maturation est même bloquée. Ce sont les facteurs environnementaux que rencontrent les anguilles en cours de migration qui déclenchent et assurent la maturation des gonades (Dufour et *al.*, 2003).

Au terme de cette seconde métamorphose en anguille argentée, les individus sont physiologiquement et anatomiquement prêts à entreprendre une longue migration océanique, de surcroît, à grande profondeur.



Figure 10: Photographie d'une anguille européenne, *Anguilla anguilla*, au stade jaune et au stade argenté

3.2.5. Deuxième migration: de l'Europe et l'Afrique du nord vers de la mer des Sargasses

Cette migration est caractérisée par une absence de prise de nourriture tout au long du voyage. Ce jeûne implique la mise en réserve d'énergie au cours de la phase de croissance, c'est-à-dire au stade anguille jaune. Ces réserves sont ensuite catabolisées au cours de la migration pour fournir l'énergie nécessaire au maintien d'une activité de nage soutenue tout au long des 5 500 km de voyage ainsi que la maturation des gonades. En fait, au cours de la phase de croissance, l'eau et les protéines sont progressivement remplacées par des lipides (Degani et *al.*, 1986). Dans une anguille argentée, plus de 80 % de l'énergie disponible est ainsi stockée sous forme de triglycérides principalement déposés entre les myotomes (Boëtius et Boëtius, 1985). Boëtius et Boëtius (1980) ont estimé que la quantité totale de lipides accumulée au stade anguille jaune doit dépasser en masse 20 % du poids total des individus au stade argenté afin de couvrir les besoins énergétiques de la migration de l'Anguille Européenne.

Enfin, à l'issue de leur long périple, les individus matures s'accoupleraient en mer des Sargasses avant de mourir d'épuisement (Tesch, 2003). La vie de l'anguille commencerait et se finirait ainsi en mer Sargasses.

Depuis la fin des années 80, le stock d'*Anguilla anguilla*, a reconnu une chute spectaculaire, allant à 99 pour cent pour le stade de civelle (Dekker, 2002). Actuellement cette espèce est considérée comme au-dessous des limites biologiques (Dekker, 2002). Des facteurs anthropiques telle que pêche, la pollution, la détérioration de l'habitat (tels que l'obstruction de la migration) et le transfert de parasites, ainsi que des processus naturels tels que les changements climatiques et océaniques et la prédation ont contribué à cette baisse.

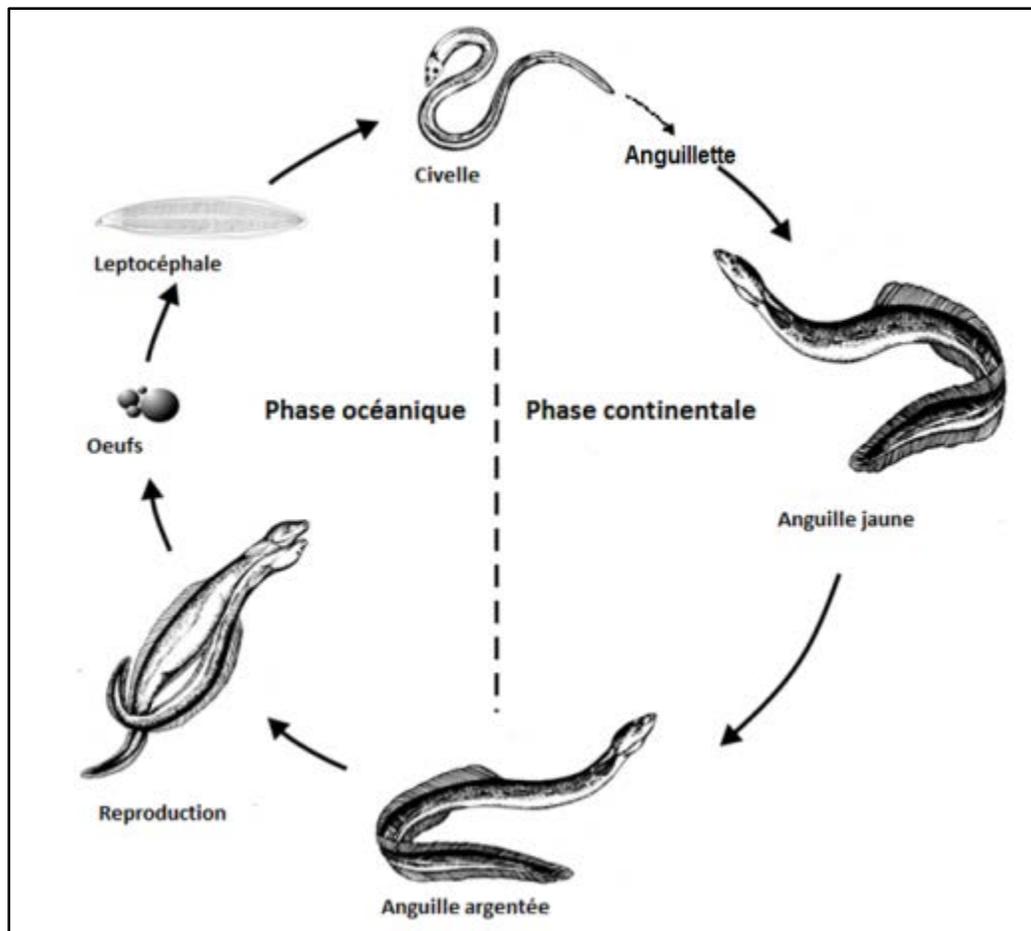


Figure 11 : Présentation schématique du cycle biologique de l'anguille européenne (Dekker, 2000).

Matériel et Méthodes

I. La matière première : Les anguilles

Les anguilles utilisées dans cette étude ont deux provenances différentes : Cinq anguilles ont été pêchées de la Meuse (Belgique) pendant le printemps (2011), dix autres ont été achetées auprès de la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas). Elles ont été identifiées par les biologistes de l'Université de Liège comme *Anguilla anguilla*. Par la suite les parties musculaires des anguilles ont été échantillonnées, séparées en deux lots différents, selon leur provenance, lyophilisées et conservées à -20°C jusqu'à utilisation. Une partie des muscles des anguilles a été dédiée aux analyses chimiques, concernant les teneurs de celle-ci en certains contaminants environnementaux.

II. Analyses chimiques des anguilles

1. Analyse des teneurs du muscle de l'anguille en PCB-NDL

La teneur des muscles des deux lots d'anguilles, en chacun des congénères PCB-NDL indicateurs (PCB n°28, 52, 101, 138, 153 et 180) a été déterminée, par une méthode conforme avec la norme Européenne EN16215 validée dans un laboratoire accrédité ISO 17025 (Centre de Recherche Analytique et Technologique, CART).

Cette méthode consiste en une extraction accélérée par solvant « ASE » (Thermo-Fisher, Palo-Alto, USA) des lipides des muscles des anguilles suivie par une étape de purification réalisée par la chromatographie multi-colonne liquide-solide branchée à un système d'automate Power Prep (FMS, Watertown, USA). Enfin l'analyse a été effectuée par chromatographie gazeuse couplée à un secteur spectromètre de masse à haute résolution (GC-HRMS Autospec Premier Waters, Millford, USA). L'analyse quantitative a été réalisée par la dilution isotopique impliquant un analogue ¹³C₁₂ de chacun des congénères des PCB-NDL indicateurs.

2. Analyse des teneurs des muscles d'anguilles en métaux lourds

Les échantillons, ont d'abord été totalement, minéralisés par la digestion dans un micro-onde (Multiwave Pro micro-ondes, Anton Paar). Par la suite ils ont été analysés par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS).

2.1. Minéralisation des échantillons

Sept millilitres d'acide nitrique et 3 ml de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés à environ 250 mg d'échantillon des muscles d'anguille pondérées dans un réacteur PFA, et le tout a été

maintenu pendant 15 mn au micro-onde à une puissance de 1500 W. Après refroidissement, les échantillons ont été récupérés dans 25 ml d'eau, puis dilués 5 fois avec de l'eau millipore avant l'analyse ICP-MS.

2.2. Analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS)

Les échantillons, déjà, minéralisés ont été analysés pour leurs teneurs en métaux (notamment Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pb, Pt et Hg) par ICP-MS sur un RDC Elan -e (Perkin Elmer, USA), équipé d'un micro nébuliseur associé à une chambre de nébulisation cyclonique. Les échantillons ont été quantifiés en utilisant le calibrage interne, fondée sur des solutions standards préparées avec une solution multi-éléments PCI standard (30E) (Chemlab, Belgique), et PCI standard Platinum (LGC Standards, France).

2.3. Analyse des teneurs des muscles d'anguilles en mercure

Les teneurs des échantillons en mercure (Hg) ont été déterminées par un analyseur direct du mercure SMS 100 (Perkin Elmer, USA), en utilisant les principes de la fusion de l'or, la décomposition thermique, et absorption atomique de la vapeur froide par spectrométrie. Trois répliques de 20-30 mg de chacun des lots d'anguilles ont été analysés. La quantification du mercure, contenu dans les échantillons, a été réalisée par des solutions d'étalonnages préparées à base de la solution standard de mercure (HIQU Plasma) (Chemlab, Belgique).

III. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux utilisés lors de cette étude sont des souris Swiss albinos (CD1). Vingt-cinq mâles et cinquante femelles sexuellement matures, âgées de 9 semaines, et d'un poids de 30 à 40 g ont été obtenus auprès de la société Charles Rivier (France). A la réception, les animaux ont été répartis dans des cages d'habitation (4 animaux du même sexe par cage) et ont été maintenus à un cycle photo-lumineux standard de 12h, à température constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) et pour une humidité relative de $50\pm 5\%$. De plus ils ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture (SDS Dietex, St Gratien, France).

IV. Mise en reproduction des souris et traitement des femelles gestantes et puis allaitantes

Après deux semaines d'habituation aux locaux, les femelles ont été mises en reproduction avec les mâles (2;1). Le lendemain, elles ont été examinées pour la détermination du succès de fécondation. Le jour où un bouchon copulatoire est observé et considéré jour gestationnel 0 (JG0). Après fécondation, 40 femelles ont été placées individuellement dans des cages, où elles ont été habituées au protocole d'exposition pendant leurs six premiers jours de gestation. Par la suite elles ont été réparties en 4 groupes d'exposition. Une semaine avant la mise-bas, du papier absorbant est fourni en tant que source de matériaux de nidification.

Au jour de la mise bas (JPN0), selon les recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) (OECD, 2007), le sexe et le poids de chaque individu de la progéniture ont été déterminés et le nombre des nouveau-nés de souris a été réduit à un effectif de $n = 10$, soit 5 mâles et 5 femelles par litière, quand c'est possible. La réduction du nombre d'animaux /portée, est attribuée à la relation qui existe entre la taille de la portée et le développement comportemental de la progéniture par rapport à l'accès au lait maternel (Tanaka, 2004). Le reste de la portée a été euthanasié à l'halothane.

A partir de la mise-bas (JPN0), les femelles ont été quotidiennement observées, et un suivi pondéral de la progéniture a été réalisé.

Au sevrage (JPN 21), les souris juvéniles de chaque litière ont été séparées suivant leur sexe dans des cages différentes. Au stade adulte (après le JPN 60) les souris mâles et les femelles de génération F1 ont été placés dans deux pièces différentes, pour exclure l'effet des phéromones sexuelles sur le comportement (figure12)

Durant le développement des souris de génération F1, des tests comportementaux et cognitifs ont été conduits conformément aux recommandations de l'OCDE (2007). Ainsi, une souris/sexe a été sélectionnée au hasard, de chaque litière, ce qui fait que le nombre d'animaux étudiés dans chaque test était de 20 souris par groupe, soit 10 animaux/ sexe/group.

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les directives de l'Union Européenne (2010/63/EU).

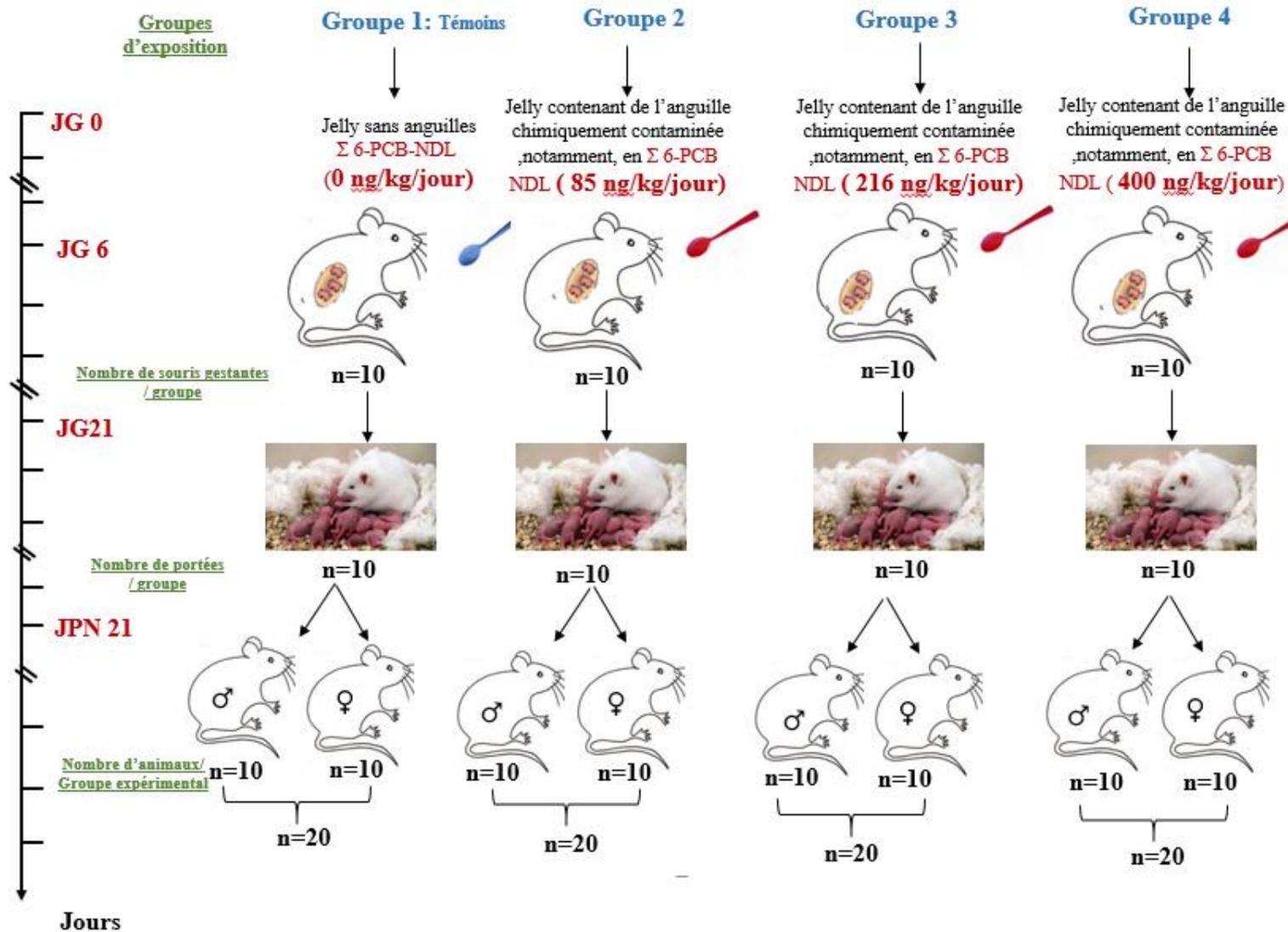


Figure 12 : Représentation schématique de la répartition des animaux par groupe expérimental et par sexe

V. Choix des doses

Le choix des doses, par lesquels les différents groupes de souris ont été traités, a été basé sur l'estimation de la prise journalière de l'Homme en la $\Sigma 6$ PCB-NDL, par la voie alimentaire, qui varie entre 10 et 45 ng/kg p.c/J (EFSA, 2005).

Ainsi les doses choisies lors de cette étude sont: 85, 216 et 400 ng/kg p.c/j. Elles ont été obtenues en multipliant les valeurs estimées, chez l'Homme par un facteur de 10 (facteur inter espèce) pour passer à l'animal.

La dose la plus faible choisie 85 ng/kg p.c/j, chez l'animal, correspond à (8,5 (chez l'Homme) $\times 10$). Elle est inférieure à la DJT, estimée de 10 ng/kg p.c/j chez l'Homme. La dose la plus élevée 400 ng/kg p.c/j (40×10) correspond à la prise journalière en la $\Sigma 6$ PCB-NDL chez les forts consommateurs du poisson tels que les pêcheurs du baltiques. Une troisième dose intermédiaire à ces 2 doses 216 ng/kg p.c/j ($21,6 \times 10$) a été, aussi, choisie (figure 13).

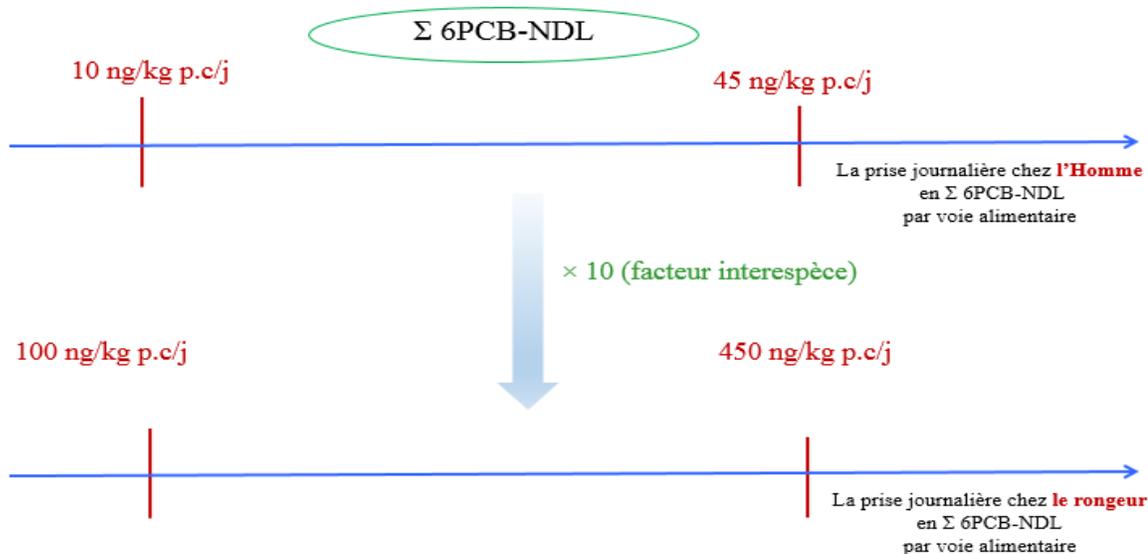


Figure 13 : Représentation schématique du choix des doses

VI. Préparation de l'aliment et exposition des animaux

Quatre lots de Jelly ont été, quotidiennement, préparés dès le début de l'exposition des souris gestantes et puis allaitantes jusqu'au sevrage. Pour ce faire 10 g de nourriture en poudre

destinée à l'alimentation des animaux (SDS DIETEX, France) ont été mélangés avec 10 ml d'eau, 0,5 ml de sirop de grenadine, 1 ml d'huile de maïs et 64 mg d'anguilles lyophilisées pour obtenir une pâte homogène, dans laquelle la dose en $\Sigma 6$ PCB indicateurs (28, 52, 101, 138, 153 et 180) a été préparé pour chaque groupe expérimental. Le lendemain de la préparation, la pâte a été découpée en petites portions en fonction du poids de chacune des souris gestantes et puis allaitantes afin d'apporter soit 0, 85, 216 et 400 ng $\Sigma 6$ PCB-NDL / kg / jour. Pour les souris du groupe contrôle (n = 10), la pâte a été préparée avec les mêmes ingrédients cités ci-dessus mais sans l'anguille (tableau (5)).

L'exposition des mères gestantes et allaitantes aux anguilles contaminées a été réalisée, par voie orale à partir du JPN 6 jusqu'au sevrage et tous les jours. Le contrôle de la prise alimentaire a été quotidien.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différents traitements utilisés

Groupe (n=10/sexe)	Origine de pêche de l'anguille	Administration pour les mères gestantes et puis allaitantes	Dose (Σ6 PCB-NDL ng/Kg)
Groupe 1 (G1)	-	Croquettes standards	0
Groupe 2 (G2)	La mer (Pays –bas)	Croquettes standards + (0,8 mg/g p.c*/j) d'anguilles	85
Groupe 3 (G3)	La mer (Pays –bas) +la rivière (la Meuse)	Croquettes standards + (0,8 mg/g p.c*/j) d'anguilles	216
Groupe 4 (G4)	La rivière (la Meuse)	Croquettes standards+ (0,8 mg/g p.c*/j) d'anguilles	400

*p.c= poids corporelle

VII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur la l'apprentissage et la mémoire

1. Test du labyrinthe en « Y » : Alternance spontanée (JPN 38)

➤ Principe

Le test du labyrinthe en « Y » permet d'évaluer la mémoire de travail, qui correspond à la capacité de retenir une information, à court terme et l'utiliser. Il est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer d'une façon spontanée et alternée les différents bras du labyrinthe (Hughes, 2004). Le test du labyrinthe en « Y » a été réalisé au JPN 38, ou les structures cérébrales impliquées, dans le fonctionnement normal de la mémoire de travail auraient atteint leurs développement normal (Luna et *al.*, 2004 ; Geier et *al.*, 2009).

Dispositif et procédure

Le labyrinthe est formé de trois bras identiques (25 ×14 ×5 cm), notés A, B et C, séparés l'un de l'autre par un angle de 120° et convergeant vers un point central (figure 14). Le labyrinthe a été faiblement éclairé (10 lux) dans chacun des bras du dispositif.

Les souris testées ont été, individuellement placées à l'extrémité du bras «A», la tête dirigée vers la paroi et elles ont été autorisées d'explorer, librement, le labyrinthe pendant 3 min. L'ordre de succession des bras parcourus par les souris a été relevé (Youssef et *al.*, 2008). Le pourcentage d'alternance spontanée était calculé selon la formule ci-dessous:

$$\% \text{ d'alternance spontanée} = (\text{Nombre d'alternance} / \text{Nombre de triplets totaux}) \times 100$$

Une alternance est définie comme la visite successive, par l'animal testé, de trois bras différents constituant un triplé eg (ABC, ACB, BCA...). Le nombre d'alternance correspond au nombre total de bras visités moins 2. Le % d'alternance spontanée des souris SWISS normaux est entre 60-70% (Belzung et *al.*, 1999).

La figure 14 montre une souris introduite dans le bras B, après l'avoir exploré, elle est passée au bras A (ligne en vert). Une fois l'exploration du bras A est terminée, la souris aurait le choix entre le bras C (ligne en rouge) ou le bras B (ligne en bleu). Si la souris choisi le bras C, elle aurait effectué une alternance.

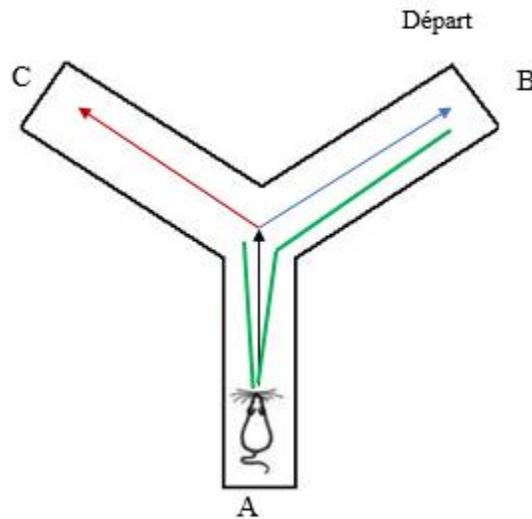


Figure 14: La représentation schématique du dispositif du test du labyrinthe en « Y »

2. Test de la piscine de Morris (JPN 120-123)

➤ Principe

Le test de Morris a été développé en 1981 par Richard Morris dans le but d'évaluer la mémoire spatiale de référence et la capacité d'apprentissage chez les rongeurs (Morris, 1984 ; Vorhees et Williams, 2006). Au cours de ce test l'animal est censé apprendre à utiliser des indices distaux pour parcourir un chemin direct vers la plate-forme cachée. La motivation dans ce test est basée sur le caractère aversif de la situation aquatique et l'aptitude de l'animal à mémoriser et apprendre à identifier l'emplacement de la plateforme qui lui permet d'échapper de la situation aversive. Le test de la piscine de Morris a été réalisé chez les souris à l'âge adulte (JPN 120-123).

➤ Dispositif et procédure

Le dispositif de ce test est un réservoir circulaire « piscine » de 100 cm de diamètre rempli au 2/3 d'eau opacifiée avec l'ajout du lait et. La température de l'eau et la même que celle de la pièce, maintenue entre 19 et 21°C. L'intensité d'éclairage est de 100 lux. Ce dispositif est virtuellement divisé en quatre quadrants égaux. Une plateforme immergée d'un centimètre d'eau a été placée dans une position fixe, au centre de l'un des quadrants (figure 15).

Pour évaluer la mémoire spatiale de référence à l'âge adulte (JPN 120), ou le cerveau atteint sa maturité, chaque souris a été placée dans l'un des quadrants, sans plateforme, et a été autorisée de faire cinq essais consécutifs (120s/essaie). Durant chaque essaie, si l'animal arrive à trouver la plate-forme dans les 120 s, il est autorisé de rester sur la plate-forme pendant 30 s. Sinon, il est conduit, par l'expérimentateur, vers la plate-forme. Durant cette étape, la tâche de l'animal testé est d'apprendre à atteindre la plate-forme cachée, dans le minimum de temps possible (≤ 120 s) en utilisant, des formes géométriques, collées à la paroi de la piscine pour lui permettre de situer sa position dans l'espace, localiser et rejoindre la plateforme immergée (Morris *et al.*, 1984).

Pour évaluer la mémoire de rétention, 72 h après la phase d'apprentissage (JPN 123) les souris testées ont été soumises à un seul essaie (120 s) pour trouver la plateforme submergée (Dridi *et al.*, 2014). Le paramètre enregistré dans ce test est la latence (s) nécessaire à l'animal pour retrouver la plate-forme pour chaque essaie.

Ainsi une molécule qui agirait sur le temps de latence en le baissant ou en l'augmentant aurait respectivement amélioré ou réduit l'aptitude d'apprentissage.

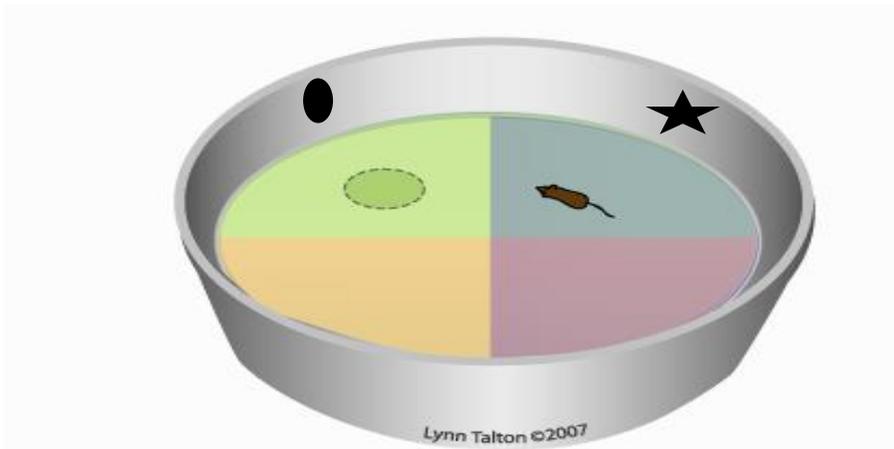


Figure 15: La représentation schématique du dispositif du test de la piscine de Morris.

VIII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité motrice

1. Test de l'open field (JPN 47, 195 et 329)

➤ Principe

Le test de l'open field, a été conçu par Hall et Ballachey (1932). Il a été utilisé dans cette étude afin d'évaluer l'activité locomotrice des animaux testés dans un milieu nouveau. Le test de l'open field a été réalisé aux différents stades de la vie des souris utilisée dans cette étude (JPN 47, 195 et 329). C'est un test contraignant par l'introduction de l'animal dans un milieu nouveau.

Une perturbation (diminution ou augmentation significative) de l'activité locomotrice des animaux traités par rapports aux témoins peut renseigner sur l'atteinte des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'activité locomotrices des animaux testés.

Dispositif et procédure

Le dispositif est constitué d'une plate-forme circulaire de 50 cm de diamètre divisée en 36 cases, répartie en 20 cases dans la zone périphérique du diapositif, 12, dans la zone médiane et 4 dans la zone centrales. Cette plate-forme est délimitée par une paroi en plexiglas noire de 27 cm de hauteur. L'éclairage a été homogène en tout point du dispositif du test (figure 16).

Les souris testées ont été, individuellement, placées dans la zone périphérique du diapositif, le visage en face de la paroi de l'appareil et ont été autorisées d'explorer librement la surface de l'open field pendant 6 min. Après 1 min d'habituation, le nombre de cases totale (périphériques + médianes + centrales) traversés par l'animal (activité horizontale) a été enregistré pendant 5 min (Bouayed *et al.*, 2009, 2012; Elnar *et al.*, 2012).

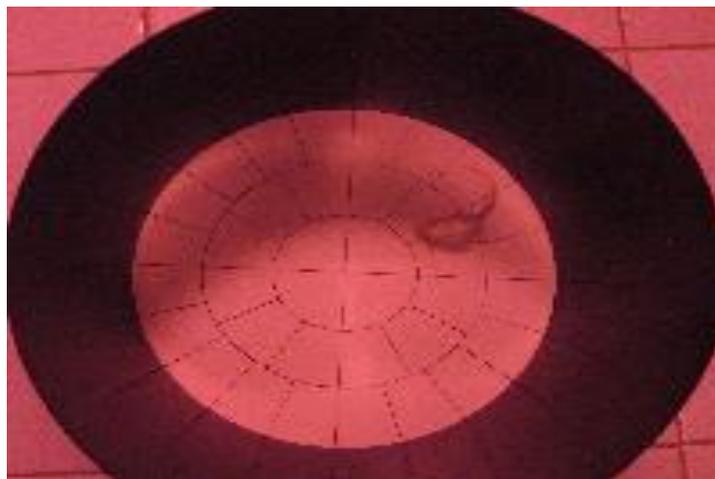


Figure 16: Dispositif du test de l'open field montrant une souris qui explore le milieu

2. Test de l'actimètre (JPN 305)

➤ Principe

Le test de l'actimètre a été utilisé pour évaluer l'activité motrice spontanée des souris testées dans un milieu familier en évitant les réponses de type néophobiques. Etant donné que l'activité motrice spontanée est l'ensemble des fonctions qui assurent le mouvement, incluant l'activité locomotrice. Le test de l'actimètre a été réalisé à un âge avancé (JPN 305) (Viggiano, 2008).

➤ Dispositif et procédure

Le dispositif utilisé est un actimètre (Bioseb, Vitrolles, France) modèle (BIO-ACV-M-pour souris) comme décrit dans la figure 17. Cet instrument utilise les vibrations de la cage pour mesurer l'activité motrice horizontale de l'animal et des détecteurs à cellule photoélectrique à infrarouge pour détecter l'activité motrice verticale de l'animal « redressement ».

Environ 24 heures avant le test, les animaux testés ont été individuellement placés dans des cages transparentes en plastique ($12 \times 35 \times 14$ cm), qui contenaient de la sciure, de l'eau et de la nourriture *ad libitum* afin de les familiariser à leurs cages. Juste avant de commencer le test, chaque cage a été calibrée et les paramètres du système ont été réglés. La durée d'acquisition a été fixée à 15 min, durant lesquelles, la distance parcourue (cm), la vitesse moyenne (cm / s), le temps d'activité (s), les mouvements et le nombre de redressement de chaque animal testé ont été enregistrés.



Figure 17: Dispositif du test de l'actimètre montrant une souris qui explore le milieu

IX. Effet « depressive like » de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les souris de génération F1

1. Test de la suspension caudale (JPN 55 et 336-337)

➤ Principe

Le Test de la suspension caudale a été décrit dans les années 80 par Steru et ses collaborateurs. Il permet l'évaluation rapide des effets psychotropes des drogues et des substances médicamenteuses sur des rongeurs, notamment les effets antidépresseurs et sédatifs (Steru et *al.*, 1985).

➤ Dispositif et procédure

Les animaux testés ont été individuellement suspendus par la queue, de telle sorte que la base de la queue soit perpendiculaire à la barre, à l'aide d'un ruban adhésif (une méthode sans douleur) (Figure 18). Les souris ainsi suspendues essaient, de manière innée, d'échapper à cette position inconfortable, en essayant de se redresser pour saisir la barre. A force d'échouer dans leurs tentatives de redressement, elles génèrent un état de désespoir qui se traduit par de l'immobilité et une résignation. Un tel comportement d'une souris peut être décrit comme « depressive like », sans que l'on puisse jamais dire que la souris est déprimée (Boissy et *al.*, 2009). La magnitude de cette immobilité est considérée comme corrélée à un comportement « depressive like ». La durée de l'enregistrement du test est de 6 min. Le temps de résignation des animaux testés n'est mesuré que lors des 4 dernières minutes de test (Steru et *al.*, 1985).



Figure 18: Le dispositif du test de la suspension caudale montrant trois souris suspendues par la queue

2. Test de la nage forcée (JPN 200 et 336-337)

➤ Principe

Le test de la nage forcée été décrit pour la première fois par Porsolt et ses collaborateurs pendant les années 70. Comme le test de la suspension caudale, Il est classiquement utilisé pour évaluer les effets psychotropes des drogues et des substances médicamenteuses sur des rongeurs (Porsolt et *al.*,1977).

➤ Dispositif et procédure

Les animaux testés ont été individuellement placés dans une cuve cylindrique, en plexiglas (9 cm de diamètre et 20 cm de hauteur), remplie jusqu'à environ 12 cm de son hauteur en eau (23 ± 1 ° C) (figure 19). Les animaux, se trouvant dans une situation non confortable, cherchent de manière innée, à s'en échapper. A force d'échouer dans leurs tentatives d'échappement, elles génèrent un état de désespoir qui se traduit par leur immobilité et leur résignation. La souris n'a été considérée immobile que lorsqu'elle flottait et ne réalisait que des mouvements de faible amplitude lui permettant de maintenir sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité des souris testées a été enregistré durant les 5 dernières minutes du test et il est corrélé avec le comportement « *dépressive like* » (Porsolt et *al.*,1977). Plus le temps d'immobilité est important plus l'animal est résigné et plus il est « *dépressive like* »

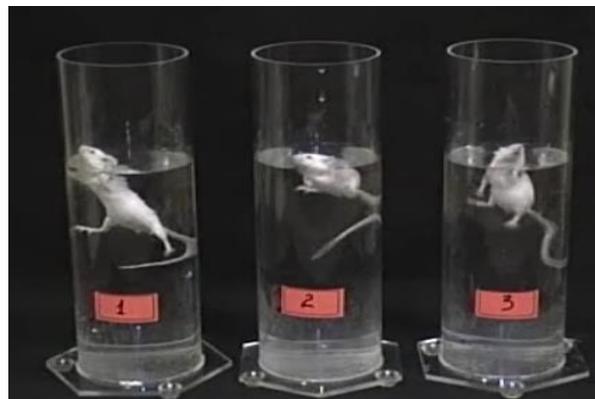


Figure n 19: Le dispositif du test de la nage forcée montrant trois souris en train d'être testées

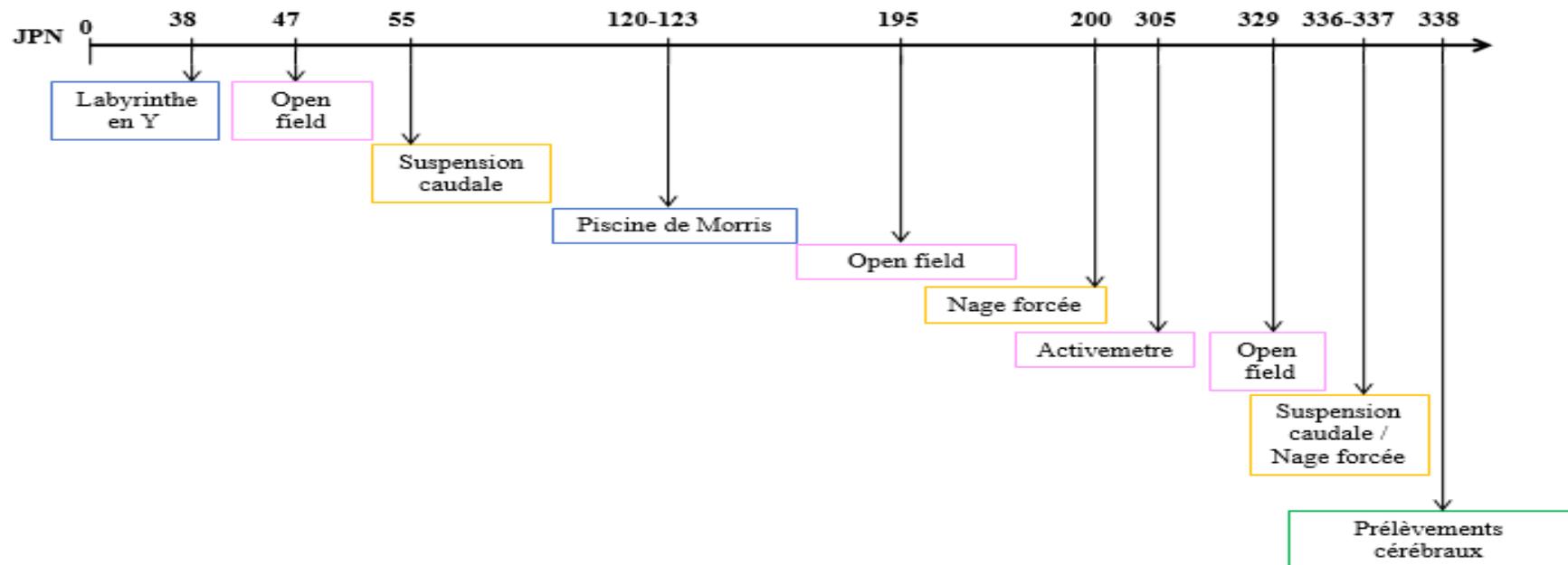


Figure 20: Schéma expérimental général mené chez la progéniture de souris exposée durant la gestation et l'allaitement aux aiguilles contaminées et les souris témoins.

Après avoir terminé les tests de comportement programmés pour cette thèse (JPN338), nous avons procédé aux prélèvements cérébraux chez les animaux testés, en vue d'établir des corrélations entre les comportements détectés et l'activité cérébrale. Les détails sont dans le paragraphe suivant.

V. Prélèvements (JPN 338)

Au JPN 338, après avoir terminé les tests de comportement programmés pour cette thèse, cinq souris/sexe/groupe, ont été choisis au hasard parmi les souris testées afin de servir pour les dosages biochimiques. Elles ont été euthanasiées à l'halothane puis sacrifiées. Ainsi, les trois régions du cerveau frais (cortex préfrontal, cervelet et hippocampe) ont été séparées pesées, rincées et puis homogénéisées dans 9 volumes (1:10, w/v) du tampon phosphate (20 Mm, pH=7,4) contenant du Kcl (140 mM), aliquotes et conservées à -80 jusqu' à analyse.

XI. Dosages biochimiques

Objectifs

Plusieurs dosages biochimiques ont été réalisés lors de cette étude. Ils ont permis de mesurer:

- L'activité de certaines enzymes antioxydantes comme la supeoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les glutathion peroxidases (GPx),
- Le taux des protéines carbonylées et du malondialdéhyde (MDA),
- L'activité de l'acétylcholinestérase

Ces dosages ont pour but d'évaluer, à un âge avancé (JPN 338), l'effet de l'exposition, des souris de génération F1, durant les périodes de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL, sur le statut oxydatif dans les trois régions cérébrales (cortex préfrontal, cervelet et hippocampe) et sur l'activité de l'acétylcholinestérase.

1. Dosage des protéines totales

Le dosage de la concentration de protéines totales a été réalisé dans les homogénats de chacune des trois régions cérébrales (cortex préfrontal, cervelet et hippocampe). Il a pour but de normaliser les résultats des dosages des protéines carbonylées, malondialdéhyde (MDA) et de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, et GPx), réalisés dans ces mêmes fractions et qui seront exprimés en par milligramme de protéines.

➤ Principe

Ce dosage a été fait selon la méthode de Bradford (1976). Il s'agit d'une méthode colorimétrique qui permet la détection et la quantification des protéines totales. Elle dépend de la formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie et les protéines en solution. Le colorant existe sous quatre formes ioniques. La concentration de protéines peut être évaluée en quantifiant la forme bleue ionique du colorant et en mesurant l'absorbance de la solution à 595 nm par spectrophotométrie (Waterborg et *al.*, 1984). Le colorant se lie surtout aux résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine, et phénylalanine des protéines (Olson et *al.*, 2007).

➤ **Mode opératoire**

Pour ce faire 900 µl de chacun des homogénats dilués ont été placés dans un tube hémolyse auquel ont été ajouté 100µl du réactif de Bradford. Après 10 minutes d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité, la densité optique (DO) de l'échantillon a été déterminée par un spectromètre (DU 720 UV Beckman Coulter, Palo Alto, CA) à 595 nm. Une gamme étalon de sérum d'albumine bovine (BSA) a été établie. Ainsi la teneur des échantillons en protéines a été déterminée en en mg/ml (Annexe 5).

2. Dosage du taux du malondialdéhyde (MDA)

Dans cette étude nous nous sommes intéressés au dosage du taux de malondialdéhyde (MDA), l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres comme étant l'un des marqueurs du stress oxydant.

➤ **Principe**

Le taux de la peroxydation des lipides a été, indirectement, déterminé par la mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) dans les homogénats des 3 régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe) par la méthode de Ohkawa et *al.* (1979). Le principe du dosage consiste à faire réagir l'acide thiobarbiturique avec l'un des produits finaux de la peroxydation lipidique: le malondialdhehyde (MDA) pour former un pigment rose possédant une absorbance maximale entre 530 et 535 nm. La densité optique du complexe TBA-MDA est proportionnelle à la concentration du MDA.

➤ **Mode opératoire**

Dans des tubes coniques contenant 100 µl des homogénats de chacune des trois régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe) on a ajouté successivement 100 µl

de sodium dodecyl sulphate (SDS) (8,1%), 750 µl d'acide acétique (20%, pH=3,5), 750µl d'acide thiobarbiturique (TBA) (0.8%) et 300µl de H₂O₂. Après une incubation de 2 heures à 95°C, les tubes coniques ont été immédiatement refroidis sous l'eau courante du robinet puis vigoureusement vortexés. Après avoir ajouté 2500 µl de n-butanol-pyridine [15:1 v/v], les tubes ont été centrifugés 800 xg pendant 5 min. Enfin le surnageant (phase organique) a été récupéré de chaque tube et l'absorbance a été lue par un spectrophotomètre (DU 720 UV, Beckman Coulter, Palo Alto, CA) à une longueur d'onde de 530 nm. La concentration du MDA a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction du MDA ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et elle est exprimée en (µmoles/ mg protéines)

3. Dosage des protéines carbonylées

Dans cette étude nous avons réalisé le dosage des protéines carbonylées comme étant l'un des marqueurs du stress oxydatif dans les trois régions cérébrales étudiées.

➤ Principe

Le dosage des protéines carbonylées a été réalisé selon la méthode de Mercier *et al.*, 2004. Il s'agit de mesurer la réactivité des groupements carbonyles avec le 2,4 dinitrophénylhydrazine (DNPH).

➤ Mode opératoire

A 200 µl de des homogénats de chacune des trois régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe), ont été ajouté 800µl de DNPH 10 mM dans le Hcl (2,5M), la solution a été incubée 1h à la température ambiante. Nous avons ajouté 1ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 20% pour précipiter les protéines, nous l'avons laissé 10 min dans la glace, puis nous l'avons centrifugé 5 min à 4000 rpm à 4°C. Nous l'avons suspendu le culot dans 1ml d'éthanol-éthylacétate (1:1, v/v) pour éliminer les traces de DNPH. Après une centrifugation de 5 min à 4000rpm à 4°C nous l'avons suspendu le culot protéique dans 500µl de guanidine hydrochloride. Une dernière centrifugation a été effectuée pour éliminer les débris qui restent.

Ainsi la concentration en protéines carbonylés (nmol/mg de protéines) a été éliminée par mesure de l'absorbance du surnageant à 370nm (sachant que le coefficient d'extinction molaire est de l'ordre de 22 nmol/ml) et en rapportant à la concentration en protéine déterminée par la méthode de Bradford.

$$\text{➤ } C = \text{DO}_{370} / \epsilon$$

C= Concentration en protéines carbonylées dans un échantillon (nmol/mg de protéines)

$DO_{370} = Do$ de l'échantillon - Do du Blanc

$\epsilon =$ Coefficient d'extinction molaire : 22 nmol/ml

4. Détermination de l'activité des superoxydes dismutases

Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés, au dosage des superoxydes dismutases (SOD) vu qu'elles constituent la première ligne de défense efficace contre les radicaux libres oxydés. Elles catalysent la dismutation du $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (McCord et Fridovich, 1969°

Principe

L'activité du superoxyde disutase (SOD), dans chacune des trois régions cérébrales (cortex préfrontal, cervelet et hippocampe), a été déterminée par la méthode de (Marklund et Marklund, 1974). Cette méthode est basée sur la compétition entre l'oxydation du pyrogallol par les radicaux superoxydes et sa dismutation par la SOD.

➤ Mode opératoire

Cent microlitres d'une solution contenant (20 mM) de pyrogallol et (0,01 M) de Hcl a été ajouté, dans un tube à hémolyse contenant 2,8 ml de tampon Tris et 100 μ l de l'homogénat de chacune des trois régions cérébrales (cortex préfrontal, cervelet et hippocampe). Par la suite le tout a été mélangé. La lecture de la DO a été faite a été faite à 420 nm après 1 min 30 s et 3 min 30 s à l'aide d'un spectrophotomètre visible (DU 720 UV, Beckman Coulter, Palo Alto, CA).

Le pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol a été calculé, et une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une inhibition de 50% de l'auto-oxydation à 25°C.

5. Détermination de l'activité de la catalase

Dans ce travail, nous avons étudié l'activité de la catalase, vu qu'elle est l'une des enzymes antioxydantes qui assure la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en libérant de l'oxygène (Halliwell, 1999),

➤ Principe

La catalase catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et eau. L'activité de cette enzyme dans les homogénats des 3 régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe) a été mesurée selon la méthode de Clairbone (1985)

➤ Mode opératoire

Vingt microlitres de chacun des homogénats des 3 régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe) ont été ajoutés à 780 µl de tampon phosphate et 200 µl de 0,5 M H₂O₂ contenus dans une cuvette en quartz. La densité optique a été lu par spectrophotométrie (DU 720 spectrophotomètre UV / Visible, Beckman Coulter, Palo Alto, CA) à 240 nm.

La pente de dégradation du substrat correspondant ΔDO/min permet le calcul de l'activité de la catalase selon la formule ci-dessous :

$$A = \frac{\Delta DO \times 10^3}{\epsilon \times l \times [p] \times Fd}$$

A : Activité spécifique de la catalase en µmoles par milligrammes de protéines et par minute

ΔDO: Variation de la densité optique lue à 240 nm

ε: Coefficient d'extinction molaire de la catalase = 0,04 mM⁻¹ cm⁻¹.

L: Longueur du trajet optique=1cm

[p]: Teneur en protéines (mg/ml)

Fd: Facteur de dilution

Les résultats sont exprimés en micromoles de H₂O₂ par minute par milligramme de protéines.

6. Détermination de l'activité du glutathion peroxydase

Le glutathion peroxydase (GPx) est l'enzyme antioxydante la plus importante au niveau du cerveau (Arivazhagan et *al.*,2002). C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à étudier son activité lors de cette étude.

➤ Principe

Les glutathion peroxydases sont des enzymes à sélénium, ayant la propriété de catalyser la réduction des hydroperoxydes (peroxyde d'hydrogène H₂O₂, hydroperoxydes organiques ROOH)

par le glutathion. L'activité glutathion peroxydase a été mesurée selon la méthode de Flohe et Günzler (1984).

➤ **Mode opératoire**

Dans un tube à hémolyse contenant 300 µl de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), 200 µl de GSH (2 mM), 100 µl de sodium azide (10 mM) et 100 µl de H₂O₂ (1 mM), 300µl des homogénats de chacune des 3 régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe) séparées, ont été ajoutés et le tout a été incubé à 37°C pendant 10 min. A la fin de l'incubation 500 µl de TCA (5%) ont été ajoutées pour arrêter la réaction et le tous a été centrifugé à 1500 g pendant 5 min, par la suite le surnageant a été récupéré. 700µl de DTNB (0,4 mg / ml), 0,2µl de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) ont été ajoutés à 100 µl du surnageant, déjà, recueilli.

La densité optique a été lue à 420 nm. L'activité enzymatique a été calculée en nM de glutathion oxydé / min / mg de protéine en utilisant un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

Dans cette étude nous nous sommes intéressés par l'étude de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) vue, le rôle important que joue cette enzyme dans la régulation du message nerveux en catalysant l'hydrolyse de l'acétylcholine.

Principe

L'acétylcholine-estérase (AChE) est une protéinase à sérine. L'activité de l'acétylcholinestérase a été mesurée selon la méthode d'Ellman et *al.*, (1961). L'acétylcholine (ACh) est hydrolysée par l'acétylcholinestérase en thiocholine et acide acétique. La thiocholine libérée réagit avec le DTNB pour donner du TNB, composé jaune. L'apparition du TNB a été mesurée, par spectrophotométrie à 412 nm, ce qui permet de calculer la variation de l'absorbance par minute sur la partie linéaire de la cinétique.

➤ **Mode opératoire**

Cinquante microlitre des homogénats de chacune des 3 régions cérébrales (le cortex préfrontal, le cervelet et de l'hippocampe) ont été ajouté au mélange réactionnel composé de 850µl de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,5), 50 µl d'acide 5,5' dithiobis-2 (8 mM). Après une

incubation à la température ambiante pendant 5 min, la réaction a été démarrée par l'addition au mélange 50µl d'acétylthiocholine (8,25 mM). L'activité de l'acétylcholinestérase était évaluée à 412 nm (à 20° C) par mesure cinétique.

L'activité de l'acétylcholinestérase a été calculée selon la formule ci-dessous :

$$A = \frac{\Delta DO \times 10^6}{\epsilon \times L \times [p] \times Fd}$$

A : Activité spécifique de l'acétylcholinestérase en nano moles par milligrammes de protéines et par minute

ΔDO : Variation de la densité optique lue à 412 nm

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de l'acétylcholinestérase = 13,6 nM⁻¹ cm⁻¹.

L: Longueur du trajet optique=1cm

[p]: Teneur en protéines (mg/ml)

Fd: Facteur de dilution

X. Analyse statistique

L'analyse de la distribution pour chacune des variables étudiées a été réalisée selon le test de Kurtosis et Skewness. Ce dernier consiste à calculer les rapports asymétrie/erreur standard et aplatissement/erreur standard. Si les deux valeurs obtenues ont été comprises entre -2 et 2, la distribution a été considérée gaussienne, le cas échéant elle a été non gaussienne.

Dans le cas d'une distribution gaussienne, les données ont été analysées à l'aide du test de la variance (ANOVA). Nous avons considéré le traitement et le sexe comme étant des mesures non appariées; l'âge comme étant une mesure appariée et le suivi pondéral ainsi que les mesures comportementales et biochimiques comme étant des variables dépendantes. Lorsque les valeurs des interactions entre les mesures non appariées (traitement, sexe et âge) ont été significatifs ($p < 0,05$), les souris mâles et femelles ont été analysées séparément.

Chez les souris de la génération F1, le traitement correspond à l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées. Les analyses post hoc (le test de Fisher) n'ont été

effectuées que lorsque la valeur de p obtenu du test à priori était $< 0,05$. Les données ont été représentées sous forme de moyenne (\pm ESM). Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Dans le cas d'une distribution non gaussienne, les résultats ont été analysés par le test de Kruskal-Wallis. Les analyses post hoc entre les groupes témoins et traités ont été conduites en Utilisant le test U de Manny-Whitney. Dans ce cas, les données ont été représentées sous forme de médiane (IQR). Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Statview® 4.5 statistical package (Abacus Concepts, In)

Résultats et Discussion

I. Analyses chimiques des anguilles

1. Résultats

1.1. Analyse des teneurs des muscles des anguilles en PCB-NDL indicateurs

La teneur des muscles d'anguilles utilisées lors de cette étude, en chacun des PCB indicateurs (PCB n°28, 52, 101, 138, 153 et 180) est présentée dans le tableau 6. Les résultats des analyses chimiques ont montré que la concentration de la $\Sigma 6$ PCB-NDL dans les muscles des anguilles pêchées dans la Meuse (Belgique) (250,5 ng/g) est légèrement inférieure à la dose maximale tolérée (300 ng/g) et elle est 5 fois supérieure à celle des anguilles pêchées, de la mer, auprès la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas) (52,9 ng/g).

Tableau 6 : Teneurs des anguilles pêchées de la Meuse (Belgique) et celles pêchées au niveau de la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas) en PCB-NDL

	Concentration des PCB (ng/g de poids frais)			References
	Anguilles pêchées de la Meuse	Anguilles pêchées auprès des Helmond	DJT* (ng/kg p.c./ jour)	
Congénères de PCB	PCB 28	8.9	6.56	ND
	PCB 52	35.6	14.34	ND
	PCB 101	31.8	9.58	ND
	PCB 138	59.3	8.94	ND
	PCB 153	78.6	10.58	ND
	PCB180	36.4	2.95	ND
	$\Sigma 6$ PCB-NDL	250.5	52.94	10
Σ PCB			20	Afssa (2006)

*DJT : Dose journalière tolérable; ND: Non définie

1.2. Analyse des teneurs des muscles des anguilles en métaux lourds

Comme pour les PCB Les teneurs des deux lots des muscles d'anguilles utilisés dans cette étude en métaux (Aluminium, Vanadium, chrome, Manganèse, fer, Cobalt, Nickel, Cuivre, Zinc, Arsenic, Sélénium, Molybdène, Cadmium, Plomb et Platine) varient selon le lieu de pêche (tableau 7). En outre les concentrations des muscles d'anguilles en mercure, plomb et en cadmium étaient inférieures aux doses maximales tolérées dans les poissons.

Tableau 7: Teneurs des anguilles pêchées de la Meuse (Belgique) et celles pêchées auprès la zone aquicole (Helmond, Pays-Bas) en métaux

Métal	Concentration des métaux (µg/g)				Références
	Anguilles pêchées à la Meuse	Anguilles pêchées auprès de Helmond (mer)	CMT ¹ dans la viande du poisson (rivière)	Dose toléré par semaine (µg/kg p.c) (<i>Tolerable weekly intake</i>)	
Aluminium (Al)	7.076	6.899	ND	1000	EFSA, 2008
Vanadium (V)	< 0,588	< 0,586	ND	ND	
Chrome (Cr)	0.594	< 0,151	ND	2100 ²	EFSA, 2014 (c)
Manganèse (Mn)	0.853	0.562	ND	ND	
Fer (Fe)	10.94	8.351	ND	ND	
Cobalt (Co)	0.015	0.028	ND	ND	
Nickel (Ni)	0.140	0.066	ND	ND	
Cuivre (Cu)	0.718	0.725	ND	3500	FAO/WHO, 2004
Zinc (Zn)	38.28	49.24	ND	7000	FAO/WHO, 2004
Arsenic (As)	3.019	< 0,475	ND	15	FAO/WHO, 2010
Sélénium (Se)	0.399	1.802	ND	ND	
Molybdène (Mo)	0.052	0.042	ND	ND	
Cadmium (Cd)	0.024	< 0,010	0,1	2,5	(EU) No. 1259/2011
Plomb (Pb)	0.049	0.033	0,3	25	FAO/WHO, 2004; (EU) No. 1259/2011
Platine (Pt)	< 0,012	< 0,012	ND	ND	
Mercure (Hg)	0,276	0,549	1	1,6	FAO/WHO, 2004; (EU) No. 1259/2011

1: concentration maximale tolérée

2: estimée à partir de la DJT

2. Discussion

Les résultats des analyses chimiques des muscles d'anguilles, utilisées lors de cette étude, corroborent avec ceux obtenus dans des études antérieures, qui ont démontré que le niveau de contamination des anguilles européennes en PCB et en métaux varie selon le stade de développement, le lieu et la saison de la pêche (Szlinder-Richert et *al.*, 2010; Blanchet Letrouvé et *al.*, 2014). Nos résultats (tableaux 7 et 8) ont montré que la teneurs des anguilles pêchées, auprès de Helmond (Pay-bas), en métaux tel que le mercure (0,549 $\mu\text{g/g}$ poids sec), le plomb (0,05 $\mu\text{g/g}$ poids sec) et le chrome (0,59 $\mu\text{g/g}$ poids sec) est supérieure à celle des anguilles pêchées dans la Meuse, respectivement (276 ng/g poids sec, 0,03 $\mu\text{g/g}$ poids sec, <0,15 $\mu\text{g/g}$ poids sec). Par contre leurs teneurs en $\Sigma 6$ PCB-NDL (52, 94ng/g poids frais), en arsenic (<0,47 $\mu\text{g/g}$ poids sec) et en cadmium <0,01 $\mu\text{g/g}$ poids sec) est inférieures à celle pêchées dans la Meuse respectivement (0,25 $\mu\text{g/g}$ poids frais, 3 $\mu\text{g/g}$ poids sec 0,02 $\mu\text{g/g}$ poids sec).

Conclusion

La grande capacité d'accumulation des anguilles en polluants dans ses muscles a été attribuée à plusieurs facteurs, y compris le régime alimentaire de cette espèce et son cycle de vie relativement long (Belpaire et Goemans, 2007; Maes et *al.*, 2008; Van Ael et *al.*, 2014). Pour ce fait ce poisson a été classé comme bioindicateur de pollution (Belpaire et Goemans, 2007).

II. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées sur le poids corporel

L'analyse ANOVA à trois facteurs a montré que l'exposition des souris de génération F1, pendant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées n'a pas eu d'effet sur l'évolution pondérale des souris étudiées [traitement: $F(3,615) = 0,18$, $p = 0,9$; traitement \times sexe: $F(3,611) = 0,038$, $p = 0,99$; traitement \times âge: $F(21,58) = 1,17$, $p = 0,26$; traitement \times âge \times sexe: $F(21,555) = 0,402$, $p = 0,99$] tout au long de la période expérimentale de 330 jours.

Toutefois, une prise de poids significative a été observée, chez les souris de génération F1, avec l'évolution de l'âge [$F(7,611) = 1108,63$, $p < 0,0001$]. Cette évolution pondérale des souris étudiées, était sexe dépendante [$F(7,611) = 7,29$, $p = 0,007$], et elle a atteint, un plateau à partir du JPN 130 aussi bien pour les souris mâles et femelles (figure 21).

Conclusion

Nos résultats ont montré que l'évolution pondérale, entre le JPN1 et le JPN 330, des animaux exposés, durant les périodes de gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées par les POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL aux doses de 85, 216 et 400 ng/kg p.c/jour est comparable à celle des animaux témoins. Donc pas d'effet sur le poids.

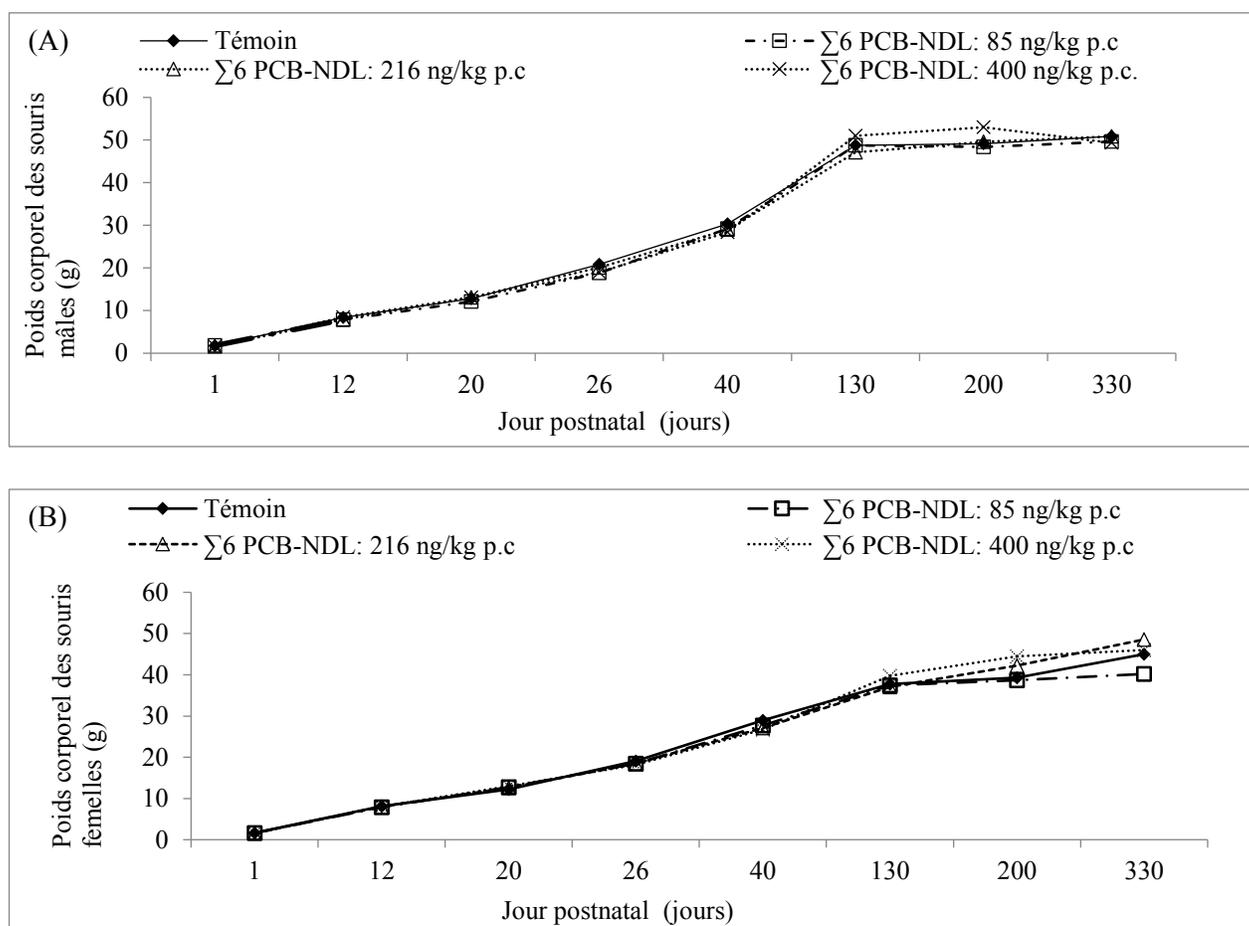


Figure 21 : Evolution pondérale (g) des souris mâles (A) et femelles (B) exposées durant la période périnatale aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL aux doses de 85, 216 et 400 ng/kg p.c. par rapport aux souris témoins (n = 7-10/groupe/sexe). Les résultats sont représentés sous forme de moyennes

III. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées sur la capacité d'apprentissage et la mémoire

1. Résultats

1.1. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur la mémoire de travail au JPN 38 dans le test du labyrinthe en « Y »

Lors de cette étude, la mémoire de travail, des souris exposées durant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL et celle des souris témoins a été testée dans le labyrinthe en Y. Le principe de ce test est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer spontanément et d'une façon alternée les différents bras du labyrinthe avec un pourcentage d'alternance d'environ 60 à 70% de succès chez les souris normales (Belzung, 1999).

Les résultats issus de l'analyse statistique obtenus dans ce test ont démontré qu'il n'y avait pas d'effets significatifs lié au traitement (l'exposition périnatale des souris aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL) [(F (3,76) = 1,305, p = 0,27], ni du sexe: [F (1,78) = 0,441, p = 0,50] ou de leurs interaction [traitement x sexes: F (1,78) = 0,441, p = 0,50] sur le pourcentage d'alternance des souris testées au JPN 38 (tableau 9).

Conclusion

Les résultats obtenus dans ce test ont montré que le pourcentage d'alternance spontanée des souris, exposées durant la période de gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL, était d'environ 63-71%, ce qui correspond aux performances normales de la mémoire des souris non traitées. Ces résultats, révèlent que la mémoire de travail, testée au JPN 38, chez les souris, exposées, pendant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL aux doses de 85, 216 et 400 ng/kg p.c/jour, n'a pas été affectée (Dridi et *al.*, 2014).

1.2. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur la mémoire spatiale de référence et la capacité d'apprentissage aux JPN (120-123) dans le test de la piscine de Morris

Dans le test de la piscine de Morris, réalisé à JPN 120 les analyses de la variance (ANOVA) à 3 facteurs (traitement, sexe et essaie) ont montré que le traitement (exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL) avait un effet significatif, lors de la phase d'acquisition, [traitement: $F(3,396) = 3,065, p = 0,02$], alors qu'aucun effet du facteur sexe [$F(1,397) = 0,102, p = 0,75$], ni du facteur essai [$F(4,395) = 1,849, p = 0,12$] ni leurs interactions [traitement \times sexe : $F(3,91) = 0,54, p = 0,65$]; [traitement \times essais : $F(12,380) = 0,52, p = 0,89$]; [traitement \times sexe \times essais : $F(12,359) = 1,10, p = 0,35$] n'a été observé.

Pour chacun des essaies réalisés, lors de la phase d'acquisition, une analyse ANOVA à 1 facteur a révélé, qu'aucune différence significative n'a été trouvée entre les différents groupes testés ($p > 0,05$), témoignant de l'absence de l'effet du traitement sur le temps de latence des souris pour atteindre la plateforme du dispositif.

En outre, après la vérification des performances des souris au JPN 123, les analyses ANOVA à 2 facteurs ont démontré qu'aucun effet significatif de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL [traitement: $F(3,76) = 0,340, p = 0,79$] ni du sexe [sexe: $F(1,78) = 0,109, p = 0,74$] ou de leur interaction [traitement \times sexe: $F(3,91) = 0,56, p = 0,63$] n'a été relevé sur le temps de latence pour atteindre la plateforme du dispositif (Tableau 9).

Conclusion

Les résultats obtenus dans le test de la piscine de Morris, réalisé au JPN (120-123) ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris testées, aux anguilles contaminées en $\sum 6$ PCB-NDL n'a pas affecté la mémoire spatiale de référence et la capacité d'apprentissage des animaux testés (Dridi et *al.*, 2014).

2. Discussion

Les résultats obtenus, lors de cette étude, dans le test du labyrinthe en « Y » et le test de Morris, suggèrent que l'exposition, durant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL, n'a pas affecté les fonctions cognitives (la mémoire et la capacité d'apprentissage) des souris issues de mères exposées (tableau 8).

Tableau 8 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur la mémoire de travail, testée dans le labyrinthe en « Y » au JPN 38, sur la capacité d'apprentissage testées et la mémoire spatiale dans le test de Morris aux JPN (120-123). Nombre d'animaux testés/sexe/groupe= 10. Les résultats sont représentés sous forme de moyennes \pm ESM.

Test	Fonction cognitive étudiée	Paramétré relevée	Âge*(jour)	$\Sigma 6$ PCB-NDL (ng/kg/jour)			
				0	85	216	400
Labyrinthe en « Y »	La mémoire de travail	% d'alternance spontanée	JPN38	62,7 \pm 4,0	62,7 \pm 3,3	64,7 \pm 3,4	71,02 \pm 2,4
			Essaie 1	53,0 \pm 8,5	52,5 \pm 11,6	38,5 \pm 8,4	34 \pm 7,6
Test de Morris	Capacité d'apprentissage	Temps de latence pour atteindre la plateforme submergée (s)	Essaie 2	45,6 \pm 8,9	56,2 \pm 11,6	36,3 \pm 6,8	47.8 \pm 9,6
			Essaie 3	51,8 \pm 8,6	52,2 \pm 9,9	30,5 \pm 7,9	51.2 \pm 10,1
			Essaie 4	34,3 \pm 8,7	48,6 \pm 11,1	28,0 \pm 32,5	37.3 \pm 8,9
			Essaie 5	38,1 \pm 8,2	36,9 \pm 10,0	25,0 \pm 7,4	37.6 \pm 7,0
			JPN 120				
	Mémoire spatiale de référence		JPN 123	26,8 \pm 5,4	28,2 \pm 8,0	23,8 \pm 4,3	29.5 \pm 33,8

*Âge des animaux testés le jour du test; JPN : Jour postnatal

Toutefois les résultats, issus, de certains travaux antérieurs traitant l'effet de la consommation des poissons contaminés par les métaux lourds et les PCB ou les contaminants généralement détectés dans la viande du poisson sur les fonctions cognitives sont controverses (Onishchenko et al., 2007; Tian et al., 2011 ; Selvakumar et al., 2012 ; Karpova et al., 2014).

En effet, plusieurs études épidémiologiques et d'autres, études expérimentales, réalisées chez les animaux, ont montré les effets négatifs de la consommation de poissons contaminés par les PCB et d'autres contaminants tels que le plomb (Pb) et le mercure (Hg) sur les fonctions cognitives (Schantz, et al., 2001 ; Power et al., 2014 ; Boucher et al., 2014 ; Orenstein et al., 2014; Debes et al., 2015 ; Garcia, 2016).

Ainsi, chez l'adulte, l'exposition humaine, par la voie d'ingestion aux poissons contaminés aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL a été associée à l'altération de la mémoire et la capacité d'apprentissage par rapport aux témoins (adulte non consommateur de poissons) (Schantz, et al., 2001

Chez les enfants, eskimos de l'Arctique Québec âgés de 6 et 11 mois, l'exposition prénatale aux PCB et au mercure (détectés dans le cordon ombilical) était à l'origine de la perturbation de leurs développement cognitif (Boucher et al., 2014). Ethier et ses collaborateurs (2015) ont montré que, l'exposition prénatale aux PCB est associée à des troubles de déficit d'attention chez les enfants âgés de 11-12, à Nunavik (Quebec, Canada). De plus, Orenstein et ses collaborateurs (2014) ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux poissons contaminés aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL du méthylmercure est associée à l'altération de la mémoire visuelle et de la capacité d'apprentissage chez les enfants. En outre une étude de cohorte réalisée par Debes et ses collaborateurs (2015) a montré que l'exposition gestationnelle aux poissons contaminés aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL du méthyl mercure, pêchés aux îles de Faroes, était à l'origine du déficit cognitif chez leurs descendances testées à l'âge de 22 ans.

Chez le rat, Gracia et ses collaborateurs (2016) ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle des animaux aux faibles doses de méthyl mercure (500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$) était à l'origine de l'altération de la mémoire spatiale de référence testée au JPN 40 dans le test de la piscine de Morris, mais pas au JPN 90.

Cependant d'autres études, corroborent avec nos résultats et ont démontré que l'exposition aux contaminants contenus dans les poissons tels que les PCB et les métaux n'a pas d'effet sur les fonctions cognitives des individus testés (Reeves et *al.*, 2003 ; Pappas et *al.*, 1998). Ainsi, une étude de cohorte, réalisée au Seychelles, a montré que la consommation des mères gestantes de 12 repas de poissons par semaine n'avait aucun effet sur les fonctions cognitives de leurs enfants âgés de 3 à 9 ans (Reeves et *al.*, 2003).

IV. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité motrice

1. Résultats

1.1. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité générale dans le test de l'open field (JPN 47, 195, 329)

Le test de l'open field a été réalisé afin d'évaluer l'activité locomotrice des animaux exposés par rapport aux témoins. Les résultats des analyses statistiques issus de ce test ont démontré que la locomotion réalisée par les souris de génération F1, ne dépendait pas du traitement [$F(3,215) = 0,83, p = 0,83$], ni du sexe [$F(1,217) = 0,59, p = 0,44$] mais elle dépendait uniquement de l'âge des animaux testés [$F(2,216) = 7,65 ; p = 0,0013$]. Cependant l'ANOVA à 3 facteurs a révélé que l'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL sur le nombre de locomotion, dépendait de l'âge et du sexe [traitement \times âge: $F(6,207) = 2,132, p = 0,05$; traitement \times sexe $F(3,211) = 5,401, p = 0,0013$].

En tenant compte de ses interactions, une ANOVA à un seul facteur a été réalisée, en analysant, séparément, les souris mâles et femelles à chaque fois que le test a été réalisé JPN 47, 195 puis 329.

Au JPN 47 aucun effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL n'a été observé sur le nombre de locomotion aussi bien pour les souris mâles [$F(3,36) = 1,568, p = 0,21$] que femelles [$F(3,36) = 0,45, p = 0,71$].

Aux JPN 195 et 329, l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL, avait un effet significatif sur le nombre de locomotion effectué par les souris femelles [$F(3,32) = 6,85, p = 0,001$ et $F(3,30) = 3,40, p = 0,03$, respectivement].

Cependant aucun effet du traitement n'a été observé sur le nombre de locomotion effectué par les souris mâles [$F(3,31) = 0,18, p = 0,90$ et $F(3,31) = 1,32, p = 0,28$, respectivement].

Chez les souris femelles, les analyses à postériori ont montré une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de locomotions effectuées par les trois groupes de souris exposées, durant la période de gestation et d'allaitement aux anguilles aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL par rapport aux souris témoins non traitées.

Ainsi, les analyses à postériori ont montré qu'au JPN 195, l'exposition, gestationnelle et lactationnelle, **des souris femelles** aux anguilles contaminées aux POP dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85, 216 et 400 ng / kg / jour était à l'origine d'une hyperactivité ($p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001$, respectivement). Cette hyperactivité a persisté jusqu'au JPN 329, chez les souris femelles de génération F1, dont les mamans étaient exposées, durant la période de gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées aux POP dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85, 216 et 400 ng / kg / jour ($p < 0,01, p < 0,05, p < 0,05$, respectivement) (figure 22).

Conclusion

Les résultats issus du test de l'open field ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85, 216 et 400 ng / kg / jour, a été à l'origine **d'une hyperlocomotion qui n'a touché que les souris femelles**. Ce comportement hyperactif, n'est **apparu que tardivement, au JPN195**, et il était persistant jusqu'aux JPN 329.

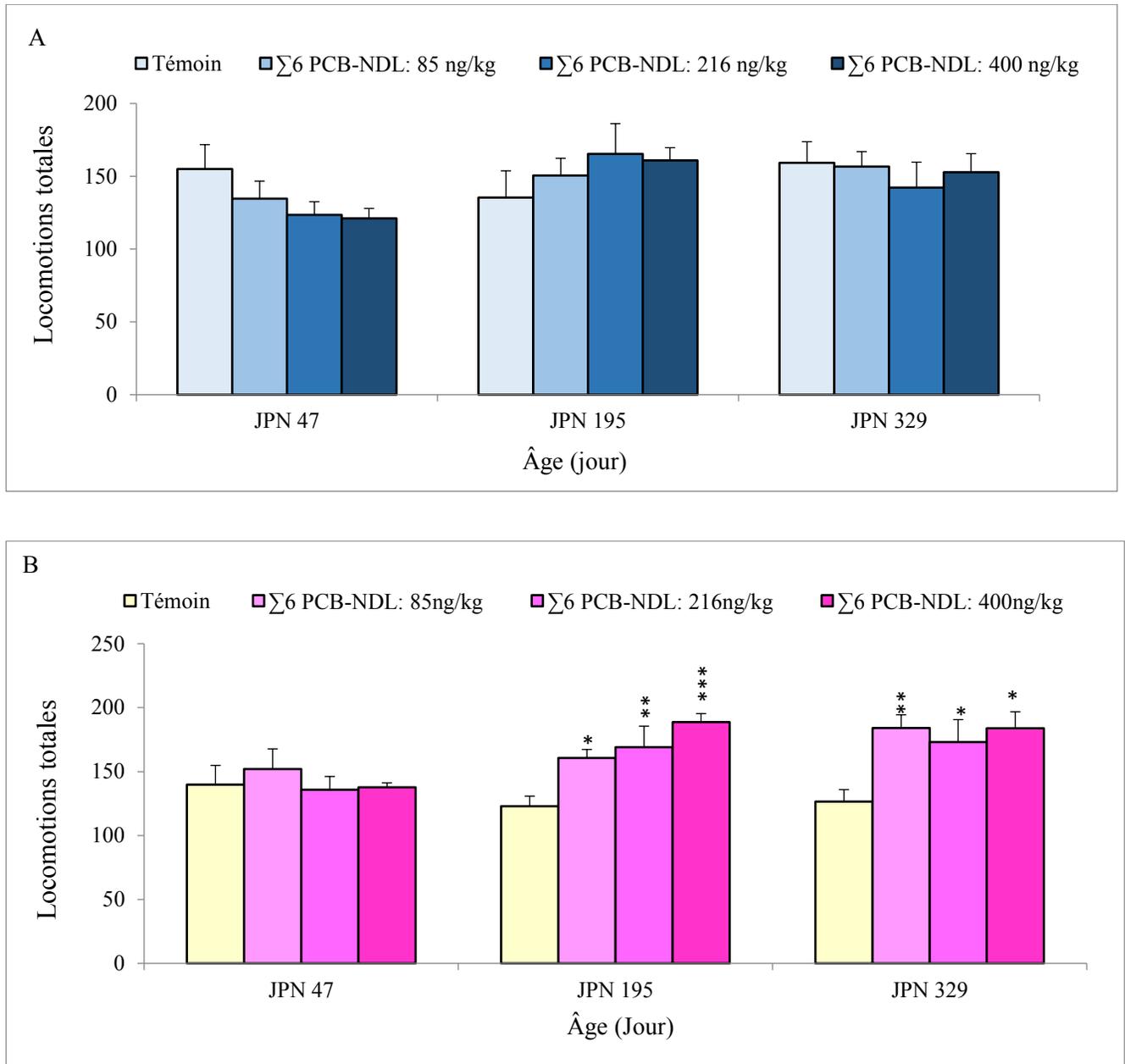


Figure 22 : Le nombre de locomotions totales effectuées par les souris mâles (A) et femelles (B) de génération F1, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées, aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour comparé à celui des souris témoins dans le test de l'open field aux JPN 47, 195, 329, (n = 7-10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes \pm ESM. *p<0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 : différences significatives par rapport au témoin.

1.2. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité générale dans le test de l'actimètre (JPN 305)

Le test ANOVA à deux facteurs (traitement et sexe) a montré que la distance parcourue par les souris pendant la durée du test (15min), dépend aussi bien du traitement (exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL [F(3,66) = 4,5, $p = 0,01$] que du sexe des souris testées [F(1,68) = 4,63, $p = 0,03$]. Une interaction significative entre ces deux facteurs a été trouvée [traitement \times sexe: F(3,62) = 3,31, $p = 0,02$].

Tenant compte de ces interactions les souris mâles et femelles ont été analysées séparément. L'ANOVA à un facteur a montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL, n'a affecté que la distance parcourue par les souris femelles [F(3,30) = 5,96, $p = 0,002$], mais pas celle parcourue par les souris mâles [F(3,31) = 0,24, $p = 0,86$]. Les analyses à posteriori ont montré **une augmentation significative ($p < 0,05$) de la distance parcourue par les souris femelles, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées contenant la $\sum 6$ PCB-NDL à la dose de 400 ng/kg/jour ($p = 0,002$) par rapport au souris femelles témoins** (Table 14).

Le test de Kruskal-Wallis a montré que l'exposition par la voie d'ingestion des souris gestantes et puis allaitantes aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL avait un effet significatif ($H = 8,25$, $p = 0,04$) sur la vitesse des mouvements, qui correspond à la distance parcourue dans la cage, pendant la période du test, divisée par le temps d'activité des souris de génération F1. Le test de Mann-Whitney a montré que **la vitesse de mouvement des trois groupes de souris femelles exposés pendant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées, aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng / kg / jour, 216 ng / kg / jour, 400 ng / kg / jour était significativement élevée [($z = -2,08$, $p = 0,03$), ($z = -2,09$, $p = 0,034$) $z = -2,58$, $p = 0,009$) respectivement] par rapport à celle des souris femelles témoins** (tableau 14).

Toutefois, l'exposition gestationnelle et lactationnelle, aussi bien des souris mâles et femelles aux anguilles contaminées, aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL n'avait **aucun effet sur le temps d'activité** [F(3,66) = 2,45, $p = 0,07$] **ni sur le nombre de redressement (activité verticale des animaux)** [F(3,66) = 0,63, $p = 0,59$] **ni leur activité globale** [F(3,66) = 1,76, $p = 0,16$].

Tableau 9: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à la chair d'anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité motrice, testée dans l'actimètre au JPN 305. Le Nombre d'animaux testés/sexe/groupe= 7-10. Les résultats de la distance parcourue, le temps d'activité, le nombre de redressement et le mouvement global sont représentés sous forme de moyennes \pm ESM. Les résultats de la vitesse moyenne sont présentés sous forme de médiane (IQR: 25 – 75). *p < 0,05, **<0, 01, ***p<0,001: différences significatives par rapport aux témoins.

Performances	$\Sigma 6$ PCB-NDL (ng/kg/jour)							
	0		85		216		400	
	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle	Mâle	Femelle
Distance parcourue (cm)	1652,22 \pm 226,59	1377,88 \pm 114,92	1652,55 \pm 189,5	2224,28 \pm 264,47	1878,33 \pm 303,66	2100,11 \pm 206,66	1856,44 \pm 271,5	3411,33 \pm 590,92 ^{***}
Temps d'activité (s)	736 \pm 67,18	839 \pm 21,11	838,44 \pm 20,32	781,57 \pm 49,22	825,55 \pm 20,33	844,33 \pm 20,36	861,11 \pm 24	889 \pm 2,86
Nombre de redressement	274,77 \pm 73,27	265,33 \pm 55,53	264,77 \pm 34,51	220,42 \pm 81,15	191,66 \pm 39,32	230,77 \pm 28,73	238 \pm 41,16	302,33 \pm 46,85
Mouvement global	460,44 \pm 68	530,77 \pm 44,89	634,44 \pm 56,03	495,42 \pm 79,53	613,33 \pm 44,47	580,44 \pm 54,23	560 \pm 70,71	680 \pm 40
Vitesse moyenne (cm/s)	3 [2,47-3,82]	2,9 [2,07-3,25]	3,15 [3-3,75]	4* [3,2-4,92]	3,2 [2,07-3,95]	4,2* [3,2-5]	3,1 [3-4,42]	3,6** [3,35-5,55]

Conclusion

Les résultats issus du test de l'actimètre réalisé au JPN 305, ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL a été à l'origine

-D'une augmentation significative ($p < 0,05$) de **la distance parcourue** par les **souris femelles**, traitées aux anguilles contaminées contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL à la dose de **400 ng/kg/jour** ($p = 0,002$) par rapport aux souris femelles témoins.

-D'une augmentation significative ($p < 0,05$) de **la vitesse de mouvement** des trois groupes de souris femelles exposés pendant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées, aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses **85 ng / kg / jour, 216 ng / kg / jour, 400 ng / kg / jour** par rapport à celle des souris témoins

-D'aucun effet significatif, sur **le temps d'activité**, ni sur le **nombre de redressement** (activité verticale des animaux), ni **l'activité globale** des souris traitées par rapport aux souris témoins.

2. Discussion

Lors de cette étude, comme il est classiquement fait pour étudier l'activité chez les rongeurs, nous avons eu recours à deux tests différents, (Viggiano, 2008). L'actimètre, où l'animal se trouve dans un milieu familier, dans une situation non contraignante ce qui permet de mesurer son activité générale en détectant tout type de mouvement (vertical et horizontal) et l'open field où l'animal se trouve dans un milieu nouveau. Les résultats issus de cette étude ont montré que l'exposition précoce des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL a été à l'origine de l'apparition d'une hyperlocomotion qui n'a touché que les souris femelles. Ce comportement, qualifié, hyperactif, n'est apparu que tardivement, dans le test de l'open field au JPN195 et uniquement chez les souris femelles et il était persistant jusqu'aux JPN (305, 329) où il a été détecté de nouveau dans le test de l'open field et le test de l'actimètre respectivement.

Des études épidémiologiques ainsi que d'autres études réalisées chez l'animal ont montré que l'exposition précoce aux poissons contaminés ou à certains contaminants du poisson tel que le MeHg et les PCB pourrait affecter l'activité motrice, même à des stades tardifs de la vie. En effet Berger et ses collaborateurs (2001) ont montré que l'ingestion, par des rats mâles adultes de

poissons contaminés, contenant l'arochlore 1248, issus du fleuve de Saint-Laurent était à l'origine d'une hyperactivité locomotrice et de l'impulsivité. En revanche l'exposition des femmes japonaises et taiwanaises enceintes, par la voie d'ingestion de l'huile de riz contaminé au PCB, était à l'origine d'hypoactivité (Harada, 1976) et d'hyperactivité (Chen et *al.*, 1994) respectivement chez leurs progénitures. Chez les rongeurs, l'exposition précoce aux PCB pourrait entraîner des perturbations de l'activité de l'animal, donnant naissance à des phénotypes hyperactifs ou hypoactifs et qui sont parfois sexe dépendants, qui apparaissent parfois chez les Mâle (Lesmana et *al.*, 2012; Kuriyama et Chahoud, 1994; Eriksson et Fredriksson, 1996; Sugawara et *al.*, 2006). Le tableau 10 résume des données obtenues à partir de travaux de recherches antérieurs étudiant les effets des expositions développementales (pendant les périodes de gestation et/ou d'allaitement) aux PCB sur l'activité motrice chez les rongeurs. La variabilité des effets de l'exposition précoce aux PCB pourrait être attribuée à plusieurs facteurs y compris les différences dans la période de l'exposition, le type de mélanges ou des composés individuels employés.

En outre, d'autres contaminants tels que le plomb (Pb), détecté aux doses 49 ng / g de poids sec et 33 ng / g de poids sec respectivement dans la chaire des anguilles pêchées de la rivière (la Meuse) et celle pêchées de la mer (Helmond), et le mercure détecté aux doses 276 ng / g de poids sec et 550 ng / g de poids sec respectivement dans la chaire des anguilles pêchées de la rivière (la Meuse) et celle pêchées de la mer (Helmond); pourraient causer l'altération de l'activité motrice. Sioen et ses collaborateurs (2013) ont montré que l'exposition prénatale au plomb augmente le risque d'apparition de l'hyperactivité de 3,34 fois aussi bien chez les garçons que chez les filles. Le plomb est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique causant la perturbation de l'activité des neurotransmetteurs du système nerveux central tels que les systèmes glutamatergique et cholinergiques pouvant conduire à la perturbation de l'activité motrice (Cory-Slechta, 1995).

Les résultats issus des études ultérieures, citées ci-dessus, montrent que l'exposition aux polluants chimiques pourrait perturber l'activité motrice et locomotrice aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. Ces résultats sont en accordance avec les nôtres, ou les souris femelles exposées, durant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées aux POP dont la $\sum 6$ PCB-NDL ont développé une hyperactivité.

Tableau 10: Compilation des données concernant les effets des expositions développementales aux PCB sur l'activité motrice chez les rongeurs

Periode d'exposition	Congénères de PCB utilisés ou mélanges utilisés	Doses	Effets sur l'activité motrice	Analyses biochimiques	Références
Exposition gestationnelle	OH-PCB 106 [§]	0.5*, 5*ou50 mg/kg tous les 48 h du JPN 3 au JPN 13)	Hyperactivité sexe dépendante, qui ne touche que les rats femelles de génération F1 (tests réalisés au JPN28)	Taux de dopamine * et de ses récepteurs D ₁ , D ₂ *-D ₅	Lesmana <i>et al.</i> , 2012
	PCB 118	375µg/kg (Une dose unique au JG 6)	Hyperactivité, apparu tardivement aussi bien chez les rats mâles et femelles de génération F1 (tests réalisés aux JPN 30-34 puis auxJPN70-74*)	Le taux de testostérone et LH Mesuré au JPN170	Kuriyama et Chahoud, 1994
Exposition Durant la période d'allaitement	PCB : 28*, 52* [#] , 118 or 156	0.18 - 3.6 mg/kg (Une dose unique au JPN10)	Perturbation persistante de l'activité spontanée (Hypoactivité puis hyperactivité) (cette étude a été réalisée uniquement sur des souris mâles) (tests réalisés à l'âge de 4 mois)	Les récepteurs cholinergiques et nicotiques au niveau du cortex cérébral [#]	Eriksson et Fredriksson, 1996
	Arochlor 1254	6-18 mg/kg/jour (exposition des mamans aux JPN 2-7 et exposition de la progéniture aux JPN 22 -42)	Pas d'effets sur l'activité des souris mâles et femelles (tests réalisés au JPN 35)	Les récepteurs de dopamine D ₁ et D ₂ , transporteurs de dopamine (DTA) et récepteurs de NMDA* chez les femelles	Tian <i>et al.</i> , 2011
	PCBs : 52 ^φ , 138* ^φ ou180 ^φ	1mg/kg/jour (JPN 7 – JPN 21)	*Une hyperactivité détectée aussi bien chez la progéniture mâle et femelle de rats (tests réalisés à l'âge de 4 mois)	Lae taux de dopamine extracellulaire dans le stratum et la graisse périrénales	Boix <i>et al.</i> , 2010
	Σ 6 PCB-NDL: 28, 52, 101, 138, 153 et 180	1*, 10* [#] ou100 ng/kg/jour (JPN 1- 21)	Une hypoactivité sexe dépendante, transitoire, qui ne touche que la progéniture mâles des souris (tests réalisés aux JPN 28*, JPN 40 et JPN160)	L'expression de l'ARN m des gènes5-HT _{1A} , GABA _{Aα1} , MOR ₁ et RyR ₃ [#] au niveau du cervelet [#] , le cortex préfrontal et l'hippocampe	Elnar <i>et al.</i> , 2012
Exposition durant la période de gestation et d'allaitement	PCB 126	100 ng/kg/jour (JG 7- JPN 21)	Une hypoactivité sexe dépendante et transitoire, qui ne touche que la progéniture femelle des rats (tests réalisés à l'âge de 2, 3, 5 et 7 mois)	ND	Cauli <i>et al.</i> , 2012
	PCB 153	1mg/kg/jour (JG 7- JPN 21)	Une hypoactivité sexe dépendante et transitoire, qui ne touche que la progéniture femelle. Apparition tardive d'une hyperactivité qui touche aussi bien les rats mâles et femelles (tests réalisés à l'âge de 2, 3, 5 et 7 mois)		
	Arochlor 1254	6, 18*, 54 mg/kg (tous les 3jours du JG 6 – JPN 20)	Une hypoactivité transitoire (cette étude a été réalisée uniquement que des souris mâles) (tests réalisés à l'âge de 8 et 9 semaines)	ND	Sugawara <i>et al.</i> , 2006
	Σ PCB: 126, 138, 153 et 180.	10 mg/kg/jour (JG 15-JG19) puis 2 fois/semaine jusqu'au JPN21	Aucun effet n'a été observé aussi bien chez les rats mâles et femelles	Expression génique des aromatses et 5α-reductase* au niveau de l'hypothalamus	Colciago <i>et al.</i> , 2009

Dans le cas des études (même ligne) ou plusieurs congénères de PCB, doses sont utilisés, les symboles *,[#] et ^φ indiquent les doses et/ou les congénères à l'origine des différences significatives avec les témoins non traités, comme ils sont utilisés pour indiquer l'âge ou l'animal a eu des perturbations de l'activité motrice ; GABA_{Aα1}: Récepteur de l'acide Gamma-aminobutyrique Aα1; JG: jour gestationnel; 5-HT_{1A}:récepteur de sérotonine 5-hydroxytryptamine 1A; OH-PCB 106 : métabolite hydroxylé de PCB 106; LH: hormone lutéinisante; MOR₁:récepteur opioïdes μ 1; NAcc: Le noyau accumbens; NMDA: acide N-methyl-D-aspartic; JPN: jour post natal ; RyR₃: récepteur de ryanodine 3; ND: Non déterminé

V. Effet « depressive-like » de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les souris de génération F1

1. Résultats

1. 1. Effet « depressive-like » de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les souris de génération F1, dans le test de la suspension caudale (JPN 55-336-337)

Dans le test de la suspension caudale, les analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs (traitement, sexe et âge) ont montré que contrairement à l'âge [$F(1,132) = 2,573, p = 0,11$], le traitement [$F(3,132) = 8,348, p < 0,0001$] et le sexe [$F(1,132) = 9,117, p = 0,0036$] avaient un effet significatif sur le temps d'immobilité, qui est l'indicateur du comportement dépressif chez les souris testés. Cependant l'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées dépendait uniquement du sexe [traitement \times sexe: $F(3,132) = 3,683, p = 0,013$; traitement \times âge $F(3,132) = 1,887, p = 0,14$; traitement \times sexe \times âge $F(3,132) = 1,836, p = 0,143$].

Prenant en compte ces interactions, une analyse ANOVA à un facteur a été effectuée, ou les souris mâles et les souris femelles ont été analysées séparément. Il semble que le traitement n'a pas affecté le temps d'immobilité chez les souris femelles de génération F1, aussi bien au JPN 55 qu'au JPN 336-337, car aucune différence significative n'a été trouvée entre les souris femelles exposées et celle du groupe témoins. Cependant pour les souris mâles de génération F1, les tests ANOVA à un facteur ont révélé qu'il existe une différence significative entre les groupes traités et le groupe témoin aussi bien au JPN 55 qu'au JPN 336-337 respectivement [$F(3,36) = 14,443, p < 0,0001$], [$F(3,30) = 3,299, p = 0,033$].

Les analyses à posteriori ont révélé qu'au JPN 55 le temps de résignation de tous les souris mâles exposées aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL aux doses de 85, 216 et 400 ng / kg / jour est significativement plus long par rapport à celui des souris mâles témoins ($p < 0,05, p < 0,0001, p < 0,0001$, respectivement). Aux JPN 336-337 le temps d'immobilité des trois groupes de souris mâles, dont les mères ont ingéré des anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL à différentes doses (85, 216 et 400 ng / kg / jour), pendant la période gestationnelle et lactationnelle, est plus long que celui des souris mâles témoins ($p < 0,05, p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement) (figure 23).

Conclusion

Les résultats issus du test de la suspension caudale ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL était à l'origine de **l'apparition d'un comportement *dépressif like*, sexe dépendant, qui ne touchait que les souris mâles et non pas les souris femelles**. Ce comportement s'est manifesté par une **augmentation significative du temps d'immobilité** chez les souris mâles dont les mères ont ingéré de l'anguille contaminée aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de **85, 216 et 400 ng/kg/jour** au **JPN 55**. Le comportement dépressif était persistant au fil du temps. Ainsi il a été, de nouveau, détecté **JPN 336-337** chez tous les souris mâles dont les mamans ont ingéré durant la période de gestation et d'allaitement des anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL.

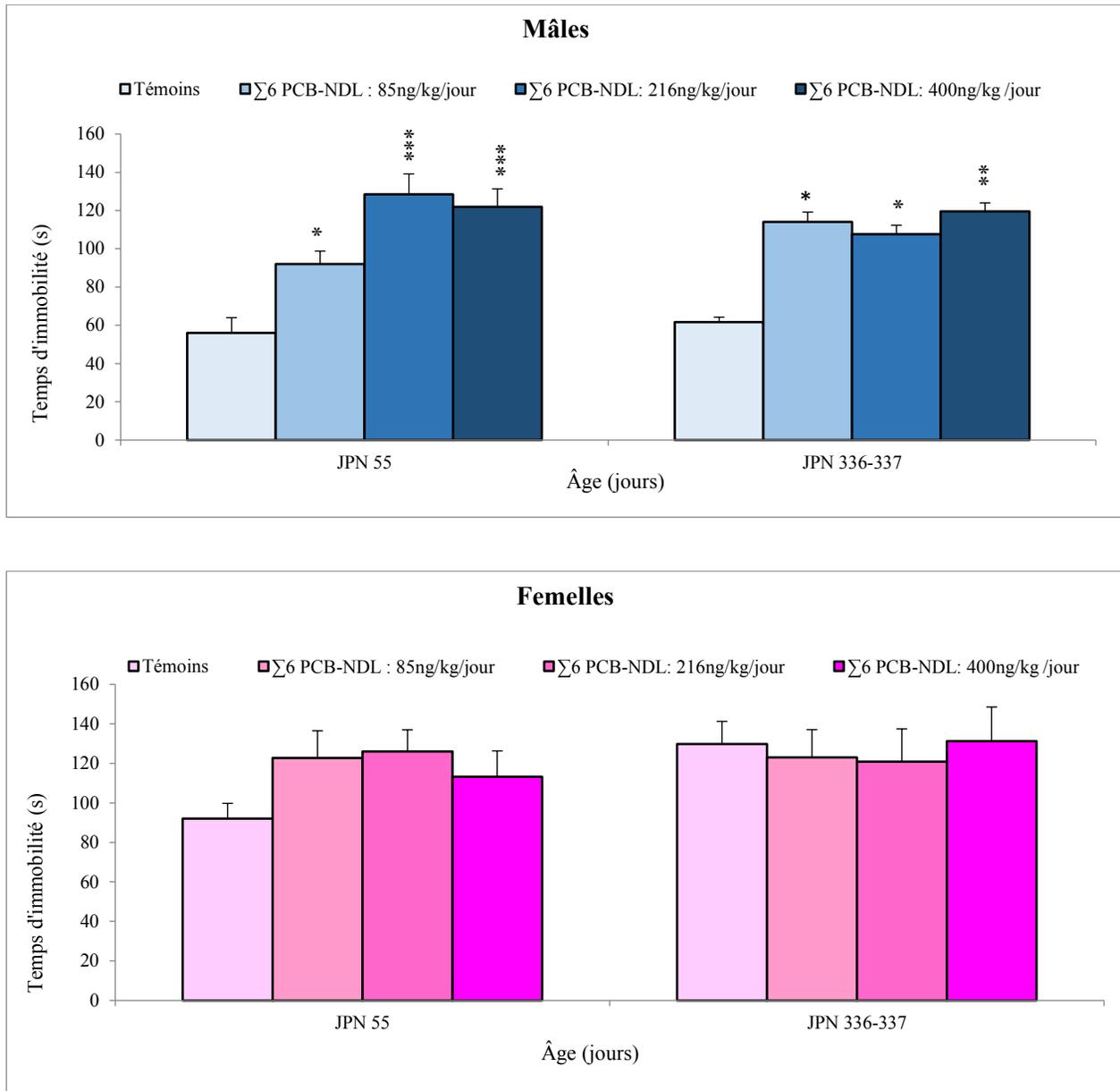


Figure 23 : Le temps d’immobilité des souris mâles et femelles de génération F1, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour comparé à celui des souris témoins dans le test de la suspension caudale réalisé aux JPN 55, 336-337, (n = 7-10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes \pm ESM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$: différences significatives par rapport aux témoins.

1.2. Effet « depressive-like » de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les souris de génération F1, dans le test de la nage forcée (JPN 200, 336-337)

Dans le test de la nage forcée, les analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs (traitement, sexe et âge) ont montré que contrairement au sexe [$F(1,147) = 8,746, p = 0,0819$], le traitement [$F(3,145) = 4,838, p = 0,0031$] et l'âge [$F(1,147) = 25,091, p < 0,0001$] ont un effet significatif sur le temps d'immobilité. Cependant l'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées, aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL dépend aussi bien de l'âge que du sexe [traitement \times sexe: $F(3,141) = 7,418, p = 0,0001$; traitement \times âge $F(3,141) = 3,279, p = 0,0229$, traitement \times sexe \times âge $F(3,133) = 1,031, p = 0,3810$]. Tenant compte de ces interactions, les analyses de la variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées, séparément, aux JPN 200 et 336-337 aussi bien chez les souris mâles que les souris femelles. Les résultats de ces analyses, ont montré que contrairement aux souris femelles, aux JPN 200 et 336-337 [$F(3,36) = 1,256, p = 0,30$ et $F(3,30) = 1,16, p = 0,34$; respectivement], l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL avait un effet significatif sur le temps d'immobilité des souris mâles [$F(3,36) = 17,636, p < 0,0001$ et $F(3,31) = 3,386, p = 0,03$, respectivement].

Les analyses à posteriori ont révélé qu'au JPN 200 les trois groupes de souris mâles, précocement exposés aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL ont manifesté un temps de résignation significativement plus élevé ($p < 0,05$) par rapport à celui des souris mâles témoins. En outre, le temps d'immobilité des souris mâles, testés aux JPN 336-337, dont les mamans ont ingéré, pendant la période de gestation et d'allaitement des anguilles contaminées, aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, et 400 ng/kg/jour était significativement plus élevé par rapport aux souris témoins ($p < 0,01, p < 0,05$, respectivement) (figure 24)

Conclusion

Les résultats issus du test de la nage forcée ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL était à l'origine de **l'apparition d'un comportement *dépressif like*, sexe dépendant, et persistant, au fil du temps, qui ne touchait que les souris mâles et non pas les souris femelles.** Ce comportement s'est manifesté au JPN 200 et **JPN 336-337** par une **augmentation significative**

du temps d'immobilité chez les souris mâles dont les mères ont ingéré des anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de **85, 216 et 400 ng/kg/jour**.

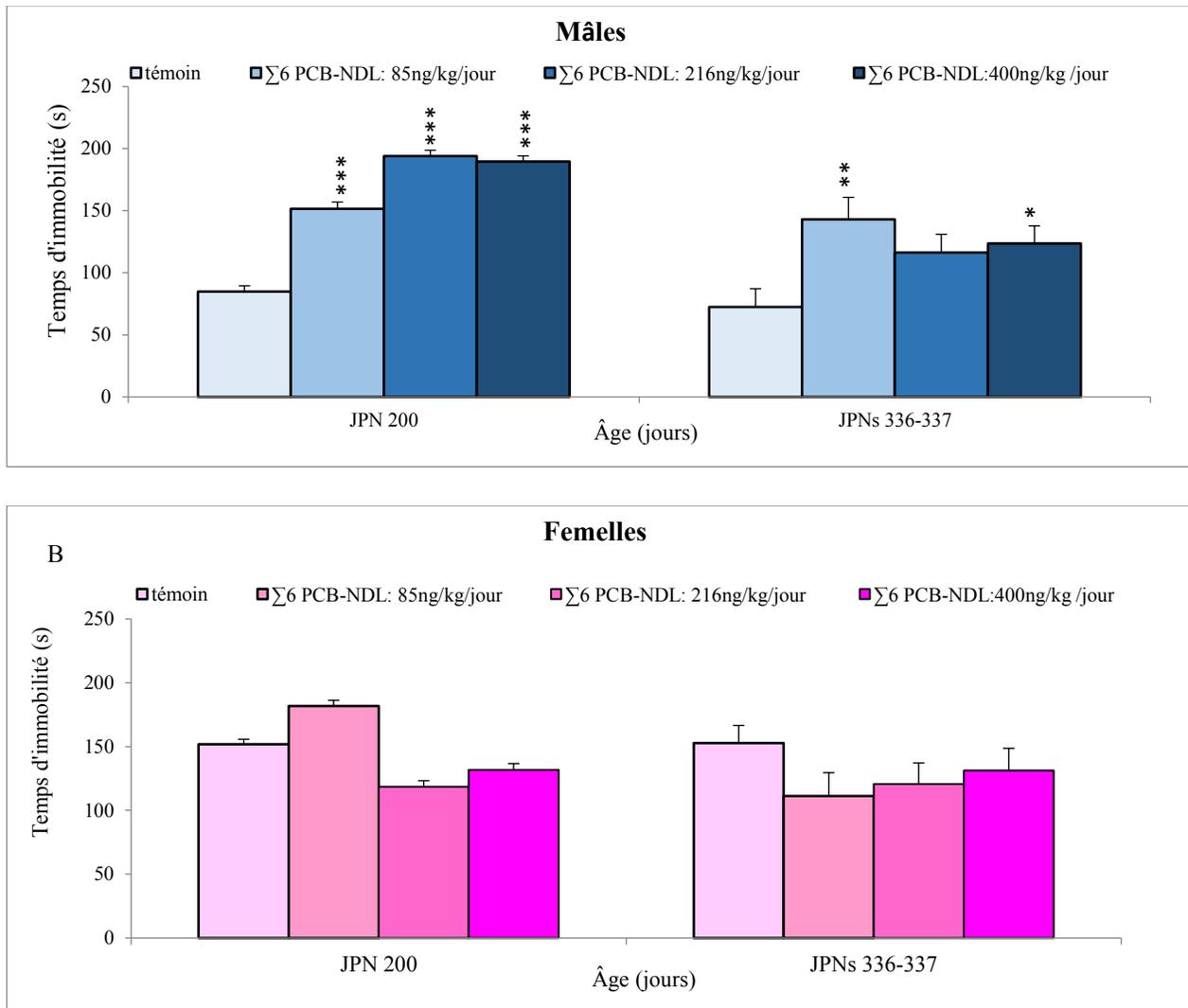


Figure 24 : Le temps d'immobilité des souris mâles (A) et femelles (B) de génération F1, , exposées durant la période gésationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées au POP, dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour comparé à celui des souris témoins dans le test de la nage forcée aux JPN 200, 336-337, (n = 7-10/sexe/groupe). Les données sont reportées en moyennes \pm ESM. *p<0,05 ; **p<0,01 ***p < 0,001 : différences significatives par rapport au témoin.

2. Discussion

Pour étudier l'effet *depressive-like* de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL, chez les souris de génération F1, nous avons utilisé deux tests : la suspension caudale et la nage forcée. Le principe de ces tests repose sur le fait de mettre les animaux testés dans une situation non-naturelle, ces derniers vont chercher à s'y échapper et à force d'échouer dans leurs tentatives d'échappement, ils génèrent un état de désespoir qui se traduit par l'immobilité. L'augmentation du temps d'immobilité est corrélée avec l'état *dépressif-like* des animaux testés.

Les résultats issus de ces deux tests ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL induisait un comportement *dépressif-like*, sexe dépendant, qui ne touchait que les souris mâles et non pas femelles. Ce comportement était persistant au fil du temps. Il a été identifié au JPN 55 et il a persisté jusqu'au JPN 336-337.

Des études antérieures réalisées sur l'Homme et sur l'animal se sont intéressées à l'effet de l'exposition aux composés nutritifs du poisson tels que les omega-3, d'une part ou à certains contaminants du poisson tel que les PCB, le mercure, le plomb d'autre part (Tiomen et al., 2004 ; Onishchenko, 2007; Elnar et al., 2012; Ng et al., 2013 ; Conner et al ; Weiser et al. 2015 ; 2015 ; Berk et al., 2014 ; Nabi et al., 2014).

Effet «*dépressive like*» de la consommation du poisson

Plusieurs études épidémiologique ont montré des corrélations négatives entre la consommation du poisson et l'atteinte par la dépression (Hibelen, 1998, Tanskanen et al., 2001, Appleton et al., 2006., Bountziouk et al., 2009; Chrysohoou et al., 2011 Smith et al., 2014).

En revanche d'autres études épidémiologiques ont montré que la consommation du poisson, aurait un effet protecteur sexe dépendant, du risque d'atteinte de la dépression, (Tiomen et al., 2004 ; Smith et al., 2014). En effet une étude de cohorte réalisée au nord de la Finlande, s'est intéressée à suivre des naissances de l'année 1966 à partir de la grossesse jusqu'à l'âge de 31 ans. Les résultats issus de cette étude ont montré que la fréquence de consommation de poisson était inversement liée et de façon sexe dépendante au risque

d'atteinte par la dépression. Cette étude a montré que la dépression n'a touché que les femmes ayant rarement consommé du poisson et non pas les Hommes (Tiomen et *al.*, 2004). De plus en Australie, une étude épidémiologique, menée chez des individus âgés de 26-36 ans a montré que les femmes qui consomment plus que 2 fois/semaine du poisson, ont moins de risque d'atteinte par la dépression, cependant aucune association n'a été trouvée entre la consommation du poisson et le risque d'atteinte par la dépression chez les Hommes (Smith et *al.*, 2014).

Effet «dépressive like» des oméga-3

Les poissons gras tel que l'anguille, sont connus par leur richesse en oméga 3. Ces composés sont réputés par leurs effets bénéfiques sur le système nerveux.

Ainsi il a été prouvé que les personnes souffrant d'une dépression ont une teneur sérique en oméga 3 inférieure à celle des personnes normales (Lin et *al.*, 2010). De plus, Weiser et ses collaborateurs (2015) ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle déficiente en acide docosahexaénoïque (DHA) pourrait être à l'origine de l'apparition de la dépression après la puberté, chez les rats mâles.

Effet «dépressive like» des contaminants du poisson (PCB, MeHg et Pb)

Les poissons gras tels que l'anguille sont connus par leurs capacité de bioaccumulation et bioamplification de certains composés lipophiles tel que les PCB et le MeHg qui sont déjà détectés dans la matrice des anguilles utilisées lors de cette étude. De nombreuses études ont établi une association entre l'exposition à ses polluants (PCB et MeHg et Pb) et l'atteinte par la dépression.

Une étude épidémiologique réalisée par Strøm et ses collaborateurs (2014) a démontré qu'il n'y a aucune association entre l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux PCB et la dépression. De plus, une étude établie par notre équipe a démontré que l'exposition lactationnelle des souris SWISS à la $\sum 6$ PCB-NDL n'a pas affecté le temps d'immobilité des souris exposées par rapport au témoins, testées au JPN 275, le test de la suspension caudale (Elnar et *al.*, 2012).

Les résultats issus des travaux de recherche concernant l'effet du mercure sur la dépression sont divers. En effet il y a des études, qui ont montré qu'il n'y a pas d'associations

entre le taux de mercure sanguin élevé et le risque d'atteinte par la dépression (Ng *et al.*, 2013; Berk *et al.*, 2014). Cependant d'autres études telles que celle réalisée par Onishchenko et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'exposition des souris, à MeHg, pendant leur développement, pourrait conduire à une dépression sexe dépendante qui ne touche que les souris mâles et persistante au fil du temps. Nabi (2014) a aussi démontré que l'exposition des rats adultes mâles aux faibles doses de MeHg était à l'origine de l'apparition des symptômes de dépression aussi bien dans le test de nage forcée que le test de la suspension caudale.

Plusieurs études ont montré, que l'exposition par voie d'ingestion au plomb, pourrait être incriminée dans l'apparition des symptômes de dépression. En effet Haider et ses collaborateurs (2013), ont montré que l'exposition des rats à 500 ppm de plomb, pendant cinq semaines, était à l'origine d'une augmentation significative du temps d'immobilité des rats traités par rapport aux souris témoins dans le test de la nage forcée. De plus De Sousa Lisboa et ses collaborateurs (2005) ont montré que, l'exposition gestationnelle et lactationnelle des rats au plomb a été liée à une dépression sexe dépendante qui ne touche que les rats femelles et pas les mâles. En effet à l'âge adulte, dans le test de la nage forcée, les rats femelles traités ont manifesté un temps de résignation, significativement plus élevé que celui des rats femelles témoins. Cependant aucun effet n'a été observé chez les rats mâles (De Sousa Lisboa *et al.*, 2005).

L'ensemble des résultats issus des études ultérieures, citées ci-dessus, montrent qu'une exposition aux polluants chimiques pourrait induire une dépression qui peut se manifester d'une façon sexe-dépendante. Ces résultats sont en accordance avec les nôtres, où les animaux ont été exposés, durant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées par une myriade de polluants inclus (MeHg, PCB, Pb) ont développé une dépression sexe dépendante. En effet la dépression n'a touché que les souris mâles et non pas les femelles.

VI. Les dommages oxydatifs causés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées

1. Résultats

1.1. Les dommages oxydatifs causés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les lipides

La mesure du taux de malondialdéhyde (MDA), dans cette étude, a été utilisée comme un indicateur de la peroxydation lipidique. Les analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs (traitement, région cérébrale et sexe) ont montré que contrairement au traitement [$F(3,88) = 1,57, p = 0,20$], le sexe [$F(1,88) = 21,64, p < 0,0001$] et la région cérébrale [$F(2,88) = 61,82, p < 0,0001$] ont un effet significatif sur le taux du malondialdéhyde (MDA).

L'effet de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées, aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL ne dépend ni de la région cérébrale ni du sexe [traitement \times région cérébrale: $F(6,88) = 1,42, p = 0,21$; traitement \times sexe $F(3,88) = 1,26, p = 0,29$, traitement \times sexe \times région cérébrale $F(6,88) = 1,822, p = 0,10$] (tableau 11).

Conclusion

Les résultats issus du dosage MDA par spectrophotométrie, ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL n'a pas d'effet sur le taux du MDA, au niveau des trois régions cérébrales étudiées (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet).

Tableau 11 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85;216 et 400 ng / kg / jour sur le taux du malondialdéhyde (MDA) au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet. n=5 souris /sexe/groupe. Le taux du MDA (μ moles/ mg protéines) est présenté sous forme de moyennes \pm ESM.

	Dose en $\Sigma 6$ PCB-NDL ng/kg/jour							
	0 (Témoin)		85		216		400	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Cortex préfrontal	4,29 \pm 1,39	5,64 \pm 2,03	4,23 \pm 1,62	4,38 \pm 1,82	4,34 \pm 1,3	4,59 \pm 1,86	3,97 \pm 0,95	7,92 \pm 0,74
Hippocampe	12,82 \pm 1,21	18,45 \pm 5,57	15,47 \pm 5,72	13,6 \pm 2,31	18,52 \pm 2,17	12,22 \pm 2,12	17,2 \pm 2,47	14,94 \pm 1,47
Cervelet	44,87 \pm 10,49	61,63 \pm 7,34	23,67 \pm 6,65	89,71 \pm 18,13	27,82 \pm 8,9	110,91 \pm 23,95	7,93 \pm 3,68	58,06 \pm 23,66

1.2. Les dommages oxydatifs causés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les protéines

Les analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs, ont montré que le traitement [$F(3,90) = 3,42, p = 0,02$], le sexe [$F(1,90) = 40,89, p < 0,0001$] et la région cérébrale [$F(2,90) = 16,41, p < 0,0001$] ont un effet significatif sur le taux des protéines carbonyles qui a été utilisé, dans cette étude, comme un indicateur de l'oxydation des protéines.

L'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées, aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL dépend de la région cérébrale et du sexe [traitement \times sexe \times région cérébrale $F(6,90) = 7,59, p < 0,0001$].

Tenant compte de ces interactions ANOVA à un facteur a été réalisée séparément chez les souris mâles et femelles dans chacune des régions cérébrales étudiées. Le traitement avait un effet significatif sur le taux de formation des protéines carbonylés, uniquement au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des souris mâles [$F(3,15) = 7,59, p = 0,016$; $F(3,15) = 37,509, p < 0,0001$, respectivement].

Les analyses à postériori ont révélé une augmentation significative du taux des protéines carbonylées au niveau du cortex préfrontal ($p = 0,009$) et de l'hippocampe ($p < 0,0001$) des souris mâles dont les mamans ont ingéré pendant la période gestationnelle et lactationnelle des anguilles aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 216 et 85 ng / kg / jour, respectivement. (Figure 25).

Conclusion

L'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL était à l'origine d'une augmentation significative du taux des protéines carbonylées par rapport aux témoins :

-Au niveau **du cortex préfrontal des souris mâles** dont les mamans ont ingéré pendant la période gestationnelle et lactationnelle des anguilles aux POP dont **la $\Sigma 6$ PCB-NDL à la dose de 216 ng / kg / jour**.

-Au niveau **de l'hippocampe des souris mâles**, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont **la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85 ng / kg / jour**.

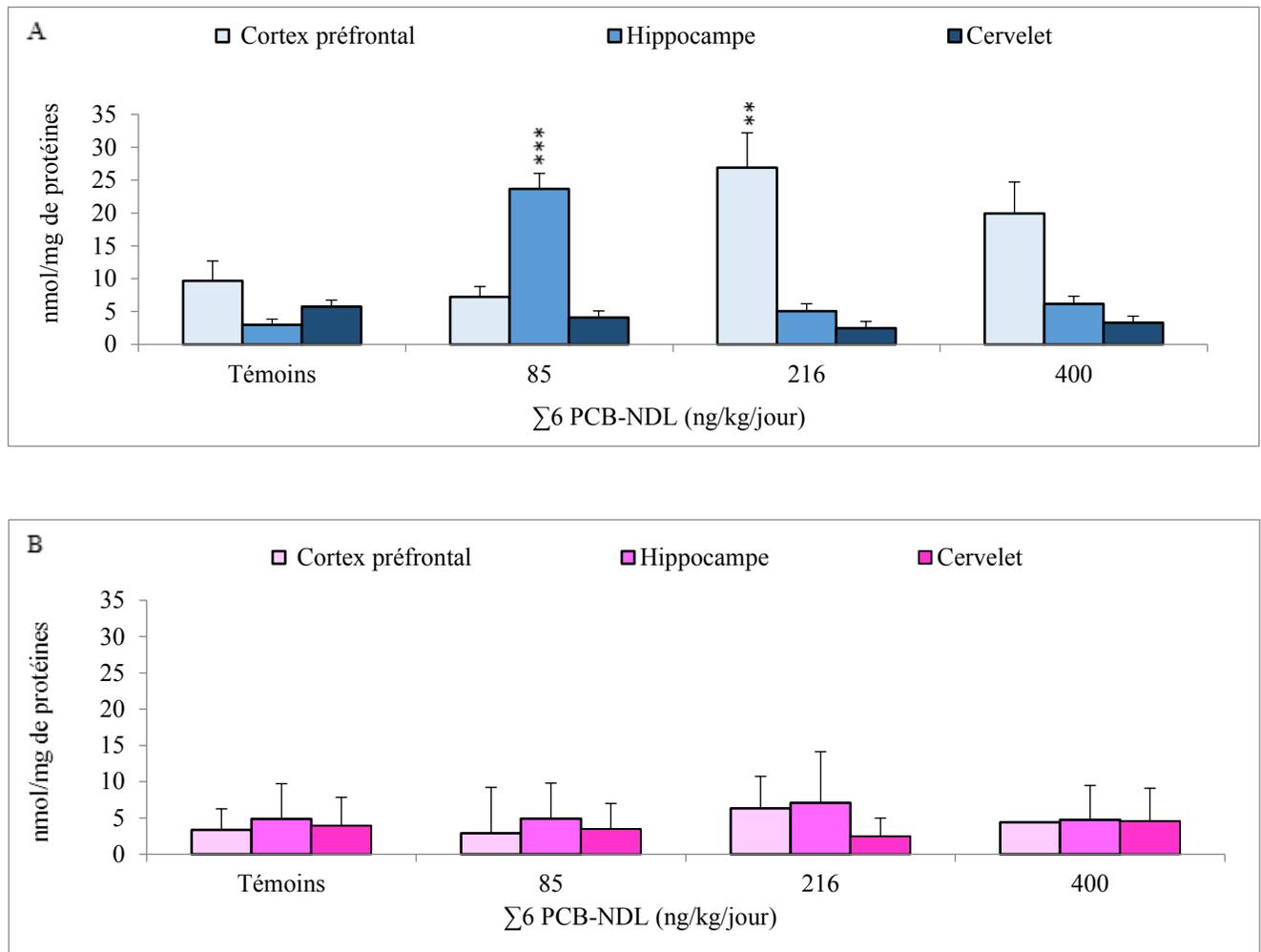


Figure 25: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur le taux des protéines carbonylées au niveau du cortex préfrontal, l'hippocampe et le cervelet des souris mâles (A) et femelles (B). n=5 souris /sexe/groupe. Le taux des protéines carbonylées (nmoles/ mg protéines) est présenté sous forme de moyennes \pm ESM. , * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, différences significatives par rapport aux témoins

VII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur l'activité des enzymes antioxydantes

1. Résultats

1.1. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'activité de la superoxide dismutase (SOD)

Les analyses de la variance (ANOVA) à trois facteurs à savoir: le traitement, le sexe et les régions cérébrales (cortex préfrontal, hippocampe, cervelet) ont montré que les trois facteurs étudiés ont un effet significatif sur l'activité de la SOD, la région cérébrale [$F(2,86) = 3,787, p = 0,02$], le traitement [$F(3,86) = 2,603, p = 0,05$] et le sexe [$F(1,86) = 9,557, p = 0,002$].

L'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées, sur l'activité de SOD dépendait du sexe des souris testées et de la région cérébrale étudiée [traitement \times sexe \times région cérébrale: $F(6,86) = 3,256, p = 0,0062$].

Tenant compte de ces interactions, les analyses de la variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées, séparément, dans chaque région cérébrale (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet), aussi bien chez les souris mâles que les souris femelles.

Au niveau de l'hippocampe, l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL avait un effet significatif sur l'activité de la SOD, uniquement chez les souris mâles [$F(3,16) = 6,102, p = 0,0057$], mais pas chez les souris femelles [$F(3,16) = 2,345, p = 0,111$]. Par contre, le traitement n'avait pas d'effets significatifs sur l'activité de la SOD au niveau du cortex préfrontal ([$F(3,13) = 1,927, p = 0,17$], [$F(3,14) = 2,732, p = 0,08$] respectivement chez les souris mâles et femelles) et au niveau du cervelet [$F(3,13) = 0,724, p = 0,55$], [$F(3,15) = 2,811, p = 0,07$], respectivement chez les souris mâles et femelles.

Les analyses à posteriori ont révélé qu'au niveau de l'hippocampe, l'activité de la SOD était significativement plus élevée chez les trois groupes de souris mâles, précocement exposés aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour, 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour ($p < 0,05, p < 0,001, p < 0,05$, respectivement) (tableau 12).

Conclusion

Les résultats issus du dosage de l'activité de la SOD par spectrophotométrie, ont montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL était à l'origine **d'une augmentation significative** de l'activité de la SOD, uniquement au niveau **de l'hippocampe de tous les souris mâles traitées**.

1.2. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'activité de la catalase

Le test Kruskal–Wallis a montré que contrairement à l’hippocampe ($H = 8,111, p = 0,04$), l’exposition par la voie d’ingestion des souris gestantes et puis allaitantes aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL n’a pas d’effet significatif sur l’activité de la catalase au niveau du cortex préfrontal ($H = 3,49, p = 0,32$) et au niveau du cervelet ($H = 4,789; p = 1,87$) des souris de génération F1.

Au niveau de l’hippocampe, les analyses à postériori ont révélé une augmentation significative, par rapport au témoin, de l’activité de la catalase, uniquement, chez les souris mâles traitées avec les doses 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour ($z = -2,619, p = 0,009; z = -2,611, p = 0,008$, respectivement). (Tableau 17).

Conclusion

Les résultats issus du dosage de l’activité de la catalase par spectrophotométrie, ont montré que l’exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL était à l’origine **d’une augmentation significative** de l’activité de la catalase, **uniquement, au niveau de l’hippocampe** des souris mâles traitées avec les doses 216 ng/kg/jour et 400 ng/kg/jour.

1.3. Effet de l’exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l’activité de la glutathion peroxydase

Le test Kruskal–Wallis a montré que l’exposition par la voie d’ingestion des souris gestantes et puis allaitantes aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL n’avait pas d’effets significatifs, sur l’activité du glutathion peroxydase au niveau des trois régions cérébrales étudiées: le cortex préfrontal ($H = 4,164, p = 0,24$), l’hippocampe ($H = 2,684; p = 0,44$) et le cervelet ($H = 2,4; p = 0,49$) des souris de génération F1. (Tableau 12)

Conclusion

Les résultats issus du dosage l’activité du glutathion peroxydase par spectrophotométrie, ont montré que **l’exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL n’a pas affecté l’activité de cette enzyme, au niveau des trois régions cérébrales étudiées** (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet).

Tableau 12 : Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle à la chair d'anguilles, contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) et du glutathion peroxydase (GPx) déterminées au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet. n=5 souris /sexe/groupe. L'activité de la SOD est présentée sous forme de moyennes \pm ESM. Les activités de la CAT (catalase) et du GPx (glutathion peroxydase) sont présentées sous forme de médiane (IQR: 25 – 75). *p < 0,05, **<0, 01, ***p<0,001: différences significatives par rapport aux témoins. SOD (pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol), Cat (μ moles/ mg protéines/mn), GPx (nM de glutathion oxydé / mg de protéine/ min)

Activité des enzymes antioxydantes	Région cérébrale	$\Sigma 6$ PCB-NDL (ng/kg/jour)							
		0		85		216		400	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
CAT	Cortex préfrontal	2,13	2,86	1,3	3,2	1,1	1,86	3,24	2,96
		[1,26-3,25]	[0,925-4,25]	[0,75-1,625]	[0,525-4,05]	[0-2,12]	[0,8-2,5]	[1,55-5,5]	[0,97-4,42]
	Hippocampe	0,019	0,016	0,04	0,024	0,1**	0,02	0,08**	0,03
		[0,007-0,036]	[0,001-0,022]	[0,029-0,063]	[0,02-0,027]	[0,084-0,1]	[0,005-0,036]	[0,07-0,09]	[0,002-0,075]
	Cervelet	0,01	0,01	0,01	0,06	0,08	0,028	0,01	0,005
		[0,005-0,019]	[0,002-0,23]	[0,005-0,015]	[0,039-0,089]	[0,004-0,01]	[0,011-0,043]	[0,001-0,019]	[0,001-0,01]
SOD	Cortex préfrontal	71,91 \pm 21,57	51,20 \pm 13,14	57,14 \pm 17,94	47,34 \pm 18,53	35,68 \pm 16,38	61,55 \pm 12,29	23,56 \pm 7,12	85,3 \pm 20,7
	Hippocampe	31,94 \pm 5,39	67,61 \pm 8,82	60,01 \pm 5,38 *	78 \pm 2,93	61,34 \pm 9,25***	84,14 \pm 1,91	65,8 \pm 11,32 *	82,71 \pm 6,37
	Cervelet	50,22 \pm 3,5	36,34 \pm 10,2	35,45 \pm 7,48	61,61 \pm 4,52	52,85 \pm 7,78	51,4 \pm 6,83	33,05 \pm 16,52	65,31 \pm 6,57
GPx	Cortex préfrontal	1,4	0,7	3	0,4	2,1	0,7	0,8	0,8
		[1-2]	[0,1-3]	[0,15-3]	[0,5-1]	[0,1-3]	[1-1]	[1-1]	[1-1]
	Hippocampe	1,1	0,83	1,9	0,3	0,8	0,5	0,6	0,1
		[1-1]	[0-0,2]	[2-3,7]	[0,2-0,4]	[0,01-0,029]	[0-1]	[0,9-1,9]	[0-0,22]
	Cervelet	2	0,5	1	0,7	1	0,6	0,8	1,1
		[1-3]	[0,43-1]	[1-1]	[0,32-1]	[1-1]	[0,45-1]	[1-1]	[1-1]

Tableau 13 : Tableau récapitulatif de l'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx), MDA et protéines carbonylées, au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet. n=5 souris /sexe/groupe. ♂ : mâles, ♀: femelles. Augmentation. Diminution. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$: différences significatives par rapport aux témoins

		Régions cérébrales	$\Sigma 6$ PCB-NDL (ng / kg / jour)					
			85		216		400	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Effet de l'exposition périnatale aux anguilles contaminées sur l'activité des enzymes antioxydantes	SOD	Cortex préfrontal	-	-	-	-	-	-
		Hippocampe	* ↗	-	*** ↗	-	* ↗	-
		Cervelet	-	-	-	-	-	-
	CAT	Cortex préfrontal	-	-	-	-	-	-
		Hippocampe	-	-	** ↗	-	** ↗	-
		Cervelet	-	-	-	-	-	-
	GPx	Cortex préfrontal	-	-	-	-	-	-
		Hippocampe	-	-	-	-	-	-
		Cervelet	-	-	-	-	-	-
Dommages oxydatifs causés par l'exposition périnatale aux anguilles contaminées	Taux de MDA	Cortex préfrontal	-	-	-	-	-	-
		Hippocampe	-	-	-	-	-	-
		Cervelet	-	-	-	-	-	-
	Taux des protéines carbonylées	Cortex préfrontal	-	-	** ↗	-	-	-
		Hippocampe	*** ↗	-	-	-	-	-
		Cervelet	-	-	-	-	-	-

2. Discussion

Le tableau 13 montre que l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL serait à l'origine de la perturbation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx). En effet, l'activité de la catalase a été significativement élevée, par rapport au témoin, au niveau de l'hippocampe des souris mâles, dont les mamans ont consommé durant la période gestationnelle et lactationnelle de l'anguille contaminée aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 216 et 400 ng / kg / jour. En outre une augmentation significative de l'activité de la SOD, a été enregistrée uniquement au niveau de l'hippocampe des souris mâles exposées, durant la période gestationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85, 216 et 400 ng / kg / jour. Cependant l'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris des générations F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL n'avait aucun effet sur l'activité du GPx au niveau des trois régions cérébrales étudiées.

L'ingestion des souris gestantes et puis allaitantes des anguilles contaminées, aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL à la dose de 216 et 85 ng / kg / jour, a été à l'origine d'une augmentation significative du taux des protéines carbonylées respectivement, au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des souris mâles génération F1.

Cependant l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL n'a pas affecté le taux du malondialdéhyde (MDA) qui a été utilisé, dans cette étude, comme un indicateur de la peroxydation lipidique.

Cette perturbation du statut oxydatif, sexe dépendante, détectée au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des souris mâles serait causée par les contaminants de l'anguille. En effet, après leur introduction dans l'organisme maternel, ces xénobiotiques tels que les PCB et les métaux lourds, seraient métabolisés en deux phases. La première phase implique des réactions de réduction, d'hydrolyse et surtout d'oxydation conduisant soit à la bio-élimination du xénobiotique ou la production de composés plus polaires tels que les PCB hydroxylés (OH-PCB) et les PCB de type sulfone de méthyle (MeSO₂-PCB) qui sont les principaux métabolites des PCB formés par le système enzymatique cytochrome P450. Lors de la deuxième phase appelée «biotransformation», les métabolites, déjà produits précédemment, seraient conjugués à des enzymes telles que la glutathion-S-transférases (GST), conduisant à la formation de composés polaires qui sont,

généralement, éliminés du corps (Taysse et al., 1998). Plusieurs xénobiotiques ont été détectés dans le sérum humain (Ali et al, 2013 ; Ben Hassine et al, 2013; Eguchi et al, 2015), le cordon ombilical (Soechitram et al 2004; Meijer et al 2008; Marek et al 2013) et ont pu être transférés à travers le placenta de la mère au fœtus (Berg et al 2010) et excrétés dans le lait maternel pendant l'allaitement (Ryan et Rawan, 2014; Wohlfahrt-Veje et al, 2014; Grumetto et al, 2015).

Après leur passage de l'organisme maternel vers les organismes en développement, ces polluants tels que les PCB, les métaux lourds et leurs métabolites sont susceptibles de perturber le métabolisme oxydatif des organismes de génération F1 (Venkataraman et al., 2007).

Plusieurs antioxydants enzymatiques tels que les SOD, CAT et GPx ont pour fonction principale de garder l'équilibre oxydant/antioxydant dans les organismes vivants.

En effet les SOD sont des métalloprotéines qui constituent la première ligne de défense efficace pour empêcher l'accumulation cellulaire de l'anion superoxyde. Elles sont censés catalyser la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (McCord et Fridovich, 1969) (figure 26). Nous avons enregistré une augmentation significative de l'activité des SOD au niveau de l'hippocampe des souris mâles exposées durant la période, gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL à aux doses de 85, 216 et 400 ng / kg / jour par rapport aux souris mâles témoins.

En outre l'activité de la catalase, une enzyme qui assure la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en libérant de l'oxygène (Halliwell, 1999) (figure 26), a été significativement élevée, par rapport au témoin, au niveau de l'hippocampe des souris: mâles, dont les mamans ont été exposée, durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL aux doses de 216 et 400 ng / kg / jour.

Concernant le GPx, qui est une sélénoprotéine, qui existe sous deux formes, la glutathion peroxydase sélénium dépendante (SeGPx) et la glutathion peroxydase sélénium-indépendante (IndSeGPx). La SeGPx peut prendre en charge la détoxification de peroxydes organiques et du peroxyde d'hydrogène, alors que l'IndSeGPx neutralise uniquement les peroxydes organiques (Burk et Walin., 1987). Selon Arivazhagan et ses collaborateurs (2002) GPx est l'enzyme antioxydante la plus importante au niveau du cerveau, vu qu'elle permet la métabolisation de H_2O_2 et la protection des membranes cellulaires de la peroxydation lipidique. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroperoxydes lipidiques (LOOH) sont éliminés suite à leur réduction à l'eau (figure 26). Dans la présente étude, aucune différence significative, n'a été enregistré, entre l'activité du GPx dans les trois régions cérébrales étudiées (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet) des souris

exposées durant la période gestationnelle et puis lactationnelle aux anguilles contaminées et celle des souris témoins.

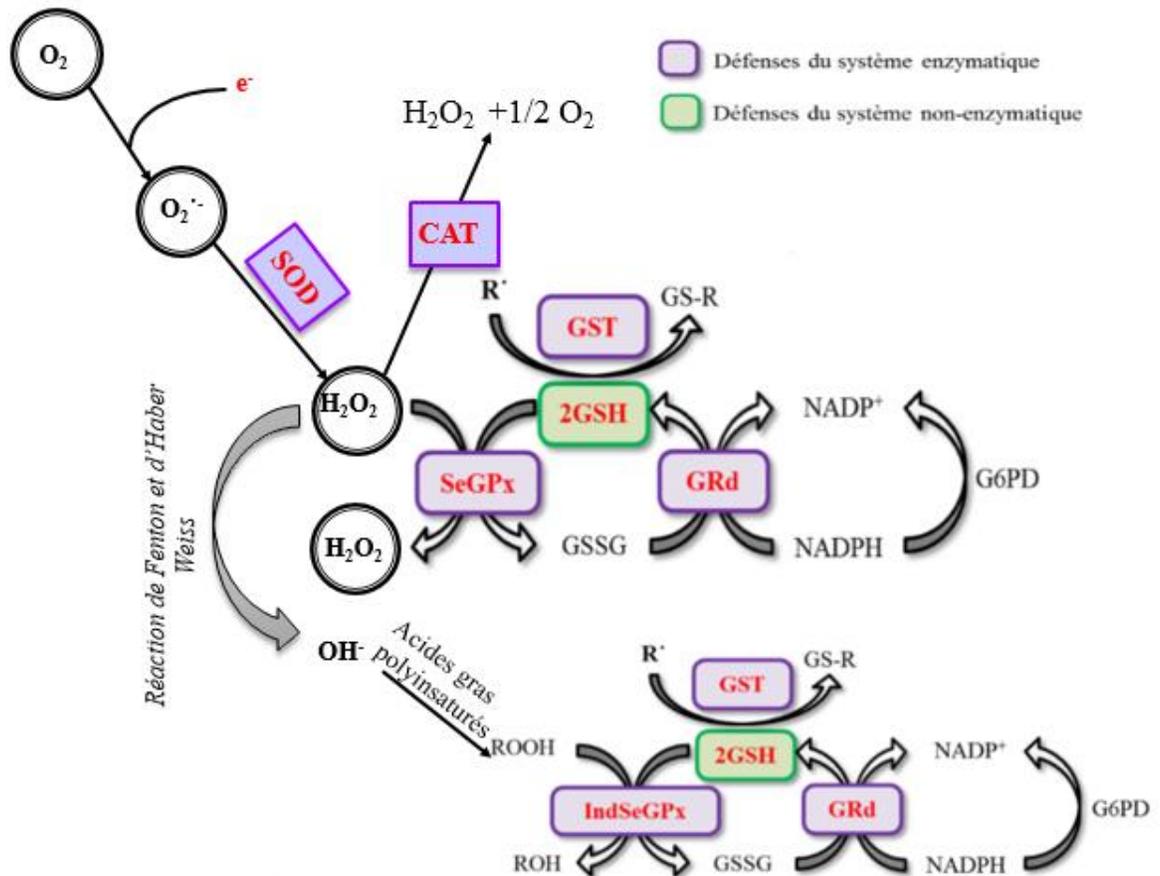


Figure 26 : Schéma des systèmes enzymatiques et non-enzymatiques de détoxification des ERO. SOD: superoxyde dismutase; CAT: catalase; SeGPx: glutathion peroxydase-sélénium dépendant; IndSeGPx: glutathion peroxydase-sélénium indépendant; GST: glutathion S-transférase; GRd: glutathion réductase; GSH: glutathion réduit.

Nos résultats concernant l'activité des enzymes antioxydantes (Cat, SOD et GPx), au niveau des différentes régions du cerveau (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet), ont montré que le cortex préfrontal et l'hippocampe sont plus vulnérables au stress oxydant que le cervelet, ce qui rejoint les résultats obtenus par plusieurs autres travaux antérieurs (Venkatarman et *al.*, 2007).

Nous avons, ainsi, démontré une augmentation significative de l'activité de la SOD et la CAT, uniquement au niveau de l'hippocampe des souris mâles, exposés pendant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées, aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL. Ce résultat corrobore avec les résultats obtenus par plusieurs travaux antérieurs qui ont aussi démontrés que l'activité des enzymes antioxydants pourrait être perturbée suite à l'exposition des rongeurs aux xénobiotiques tels que les PCB (Murugesan et *al.*, 2005; Muthuvel et *al.*, 2006; Venkataraman et *al.*, 2007; Lee et *al.*, 2012; Selvakumar et *al.*, 2012) ou à certains métaux tels que le méthylemercure (Aschner et *al.*, 2007; Franco et *al.*, 2009; Stringari et *al.*, 2010), et le plomb (Moreira et *al.*, 2001).

La perturbation de l'activité des enzymes antioxydantes, marqueur d'une activité pro-oxydante serait à l'origine de l'augmentation du taux des radicaux libres, qui peuvent diffuser dans le cytoplasme et à travers les membranes, pour altérer des composants cellulaires (Boveris et *al.*, 1972). De plus, l'attaque des composants organiques des cellules (lipides, protéines ou glucides) engendre la transmission d'une cascade radicalaire, soit à l'intérieur d'une même molécule, soit à l'intérieur d'un même tissu en agissant d'une molécule à une autre. En absence d'équilibre oxydant-antioxydant, dans l'organisme, le phénomène de dégradation pourrait évoluer d'une façon exponentielle (Neuzil et *al.*, 1993). L'une des conséquences de l'absence de l'équilibre oxydant-antioxydant est l'oxydation des protéines. Les produits les plus courants de l'oxydation des protéines dans les échantillons biologiques sont les dérivés carbonylés de protéine Pro, Arg, Lys, Thr. Ces dérivés sont chimiquement stables et sont généralement utilisés comme des marqueurs du stress oxydatif.

Dans cette étude, le taux des protéines carbonylées a été déterminé selon la méthode de Mercier et ses collaborateurs (2004). Nos résultats ont montré une augmentation du taux des protéines carbonylées, au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des souris mâles et exposés durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL respectivement aux de doses de 216 et 85 ng / kg / jour.

Cependant aucun effet n'a été relevé sur les lipides. Nos résultats sont en concordance avec les résultats de travaux antérieurs obtenus par d'autres équipes. En effet Grotto et ses collaborateurs (2011) ont essayé de mimer le régime alimentaire de la population riveraine de l'amazone, en donnant à des rats mâles adultes, pendant 12 semaines, un aliment à base de poisson contaminé par MeHg. Les résultats de cette étude ont montré que la consommation chronique de poisson

contaminé par MeHg était à l'origine de la perturbation du statut oxydatif (augmentation du taux de MDA) mesuré dans le sang et le plasma des rats adultes. Par contre aucun effet n'a été enregistré sur l'activité des enzymes antioxydantes (CAT, GPx, SOD) ni sur le taux de protéines carbonylées. En outre Anilakumar et ses collaborateurs (2002) ont démontré une diminution de l'activité du glutathion et une augmentation du taux du MDA hépatique, après l'exposition des rats males, pendant quatre semaines, à un régime alimentaire enrichi en maquereaux (poisson prédateur) séché.

VIII. Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur de l'acétylcholinestérase (AChE)

L'acétylcholine (ACH) est l'un des neurotransmetteurs important pour le système nerveux central (SNC), qui en se fixant aux récepteurs cholinergiques membranaires (muscariniques ou nicotiniques), permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx nerveux. L'action de ce neurotransmetteur est dépendante de son enzyme de métabolisation, l'acétylcholinestérase (AChE), une protéinase à sérine, qui joue un rôle primordial dans la régulation de l'influx nerveux. Elle catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide acétique, une réaction nécessaire pour permettre à un neurone cholinergique de revenir à son état de repos après l'activation (figure 27). L'AChE est exprimée dans de nombreux tissus. Mais c'est à la jonction neuromusculaire ou dans les synapses reliant certains neurones qu'elle remplit son rôle le mieux connu (Silman & Sussman 2005).

La mesure de l'activité d'acétylcholinestérase (AChE) est, généralement utilisée comme un indicateur de l'intégrité de la transmission nerveuse (Vincent et *al.*, 1992).

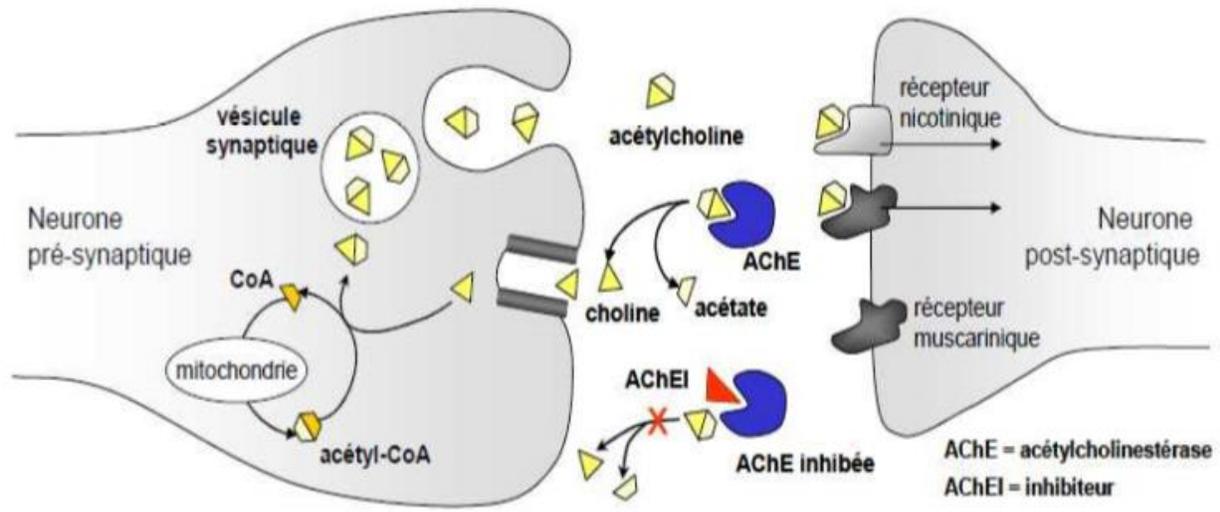


Figure 27 : Schéma représentatif d'une synapse et des mécanismes de neurotransmission cholinergique (Urbain 2007).

1. Résultats

L'analyse ANOVA à trois facteurs (traitement, sexe et régions cérébrales) a montré que contrairement au facteur sexe [$F(1,96) = 1,750, p < 0,18$], le facteur traitement [$F(3,96) = 8,33, p < 0,0001$] et le facteur régions cérébrales [$F(2,96) = 89,057, p < 0,0001$] avaient un effet significatif sur l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du cerveau.

L'effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\sum 6$ PCB-NDL sur l'activité de l'acétylcholinestérase dépend du facteur sexe et du facteur région cérébrale [sexe \times traitement $F(3,31) = 5,887, p = 0,001$; région cérébrale \times traitement $F(2,96) = 3,250, p = 0,001$].

Tenant compte de ces interactions, les analyses de la variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées, séparément, dans chaque région cérébrale (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet), aussi bien chez les souris mâles que les souris femelles.

Au niveau du cortex préfrontal, l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées avait un effet significatif sur l'activité de l'acétylcholinestérase, uniquement chez les souris femelles [F(3,166) = 6,559, $p < 0,0042$] et pas les souris mâles [F(3,16) = 3,373, $p < 0,77$].

Au niveau de l'hippocampe l'activité de l'acétylcholinestérase a été affecté par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aussi bien chez les souris mâles [F(3,16) = 8,481, $p < 0,0013$] que femelles [F(3,16) = 6,271, $p < 0,0051$].

Cependant au niveau du cervelet, le traitement n'avait aucun effet significatif sur l'activité de l'acétylcholinestérase, aussi bien chez les souris mâles [F(3,16) = 0,940, $p < 0,44$] que femelles [F(3,16) = 1,123, $p < 0,36$].

Les analyses à postériori ont révélé que l'activité de l'acétylcholinestérase a été significativement inhibée, par rapport aux témoins, au niveau du cortex préfrontal des souris femelles traitées avec la dose la plus faible (85 ng/kg/jour ($p = 0,0042$) et celles traitées avec la dose la plus élevées 400 ng/kg/jour ($p = 0,0006$) (Tableau 15). En outre l'activité de cette enzyme a été aussi significativement inhibée au niveau de l'hippocampe de tous les groupes de souris femelles, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour ($p = 0,0043$), 216 ng/kg/jour ($p = 0,0042$) et 400 ng/kg/jour ($p = 0,0014$) et chez les souris males dont les mamans ont été traitées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng/kg/jour ($p = 0,0006$) (Tableau 14).

Conclusion

L'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL était à l'origine d'une inhibition significative de l'activité de l'acétylcholinestérase par rapport aux témoins :

-Au niveau **du cortex préfrontal des souris et femelles** dont les mamans ont ingéré pendant la période gestationnelle et lactationnelle des anguilles aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL **à la dose de 85ng / kg / jour**.

Tableau 14: Effet de l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP, y inclus la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 85; 216 et 400 ng / kg / jour sur l'activité de l'acétylcholinestérase (nanomoles d'acétylcholine hydrolysée /minute/milligramme de protéine, déterminée au niveau du cortex préfrontal, de l'hippocampe et du cervelet. n=5 souris /sexe/groupe. L'activité de l'acétylcholinestérase est présentée sous forme de moyennes \pm ESM. *p < 0,05, **p<0, 01, ***p<0,001: différences significatives par rapport aux témoins.

Activité de acétylcholinestérase	Dose en $\Sigma 6$ PCB-NDL ng/kg/jour							
	0 (Témoin)		85		216		400	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Cortex préfrontal	20,53 \pm 4,6	21,07 \pm 4,44	15,87 \pm 4,85	10,86 \pm 0,52 *	23,77 \pm 6,14	14,73 \pm 1,57	24,14 \pm 8,7	6,07 \pm 1,42 ***
Hippocampe	194 \pm 31	381 \pm 82	178 \pm 35 **	176 \pm 39 **	221 \pm 58	160 \pm 23 **	205 \pm 23	125 \pm 9 **
Cervelet	85,17 \pm 21,61	62,45 \pm 11,64	62,45 \pm 11,64	84,76 \pm 12,83	86,15 \pm 12,23	76,77 \pm 11,69	61,29 \pm 6,37	62,37 \pm 6,4

-Au niveau **de l'hippocampe de tous les souris femelles**, exposées durant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées **et chez les souris mâles dont les mamans ont reçu** durant la période de gestation et d'allaitement des anguilles aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL **à la dose de 85 ng / kg / jour.**

2. Discussion

La mesure d'activité de l'acétylcholinestérase est couramment utilisée, par plusieurs chercheurs comme un indicateur de l'intégrité de la transmission nerveuse. L'inhibition de l'activité de cette enzyme est pourrait être attribuée à plusieurs polluants environnementaux tel que les PCB, le cadmium, le plomb, MeHg (figure 28), qui ont été détectés dans les anguilles utilisées, lors de cette études, (Vincent et *al.*, 1992; Venkataraman et *al.*, 2008; El-Demerdash et *al.*, 2001 ; Selvakumar et *al.*, 2012 ; Richetti et *al.*, 2011 ; Haider et *al.*, 2015). Plusieurs études antérieurs, réalisée chez les animaux ont montré que l'activité de l'acétylcholinestérase pourrait être inhibée suite à l'exposition à ces polluants. En effet le traitement des rats adultes par l'Aroclor 1254 à la dose de 2 mg/kg p.c, pendant 30 jours a causé une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase mesurée au niveau de l'hippocampe (Selvakumar et *al.*, 2012). De plus Venkataraman et ses collaborateurs (2008) ont montré que l'exposition des rats adultes à l'Aroclor 1254 à la dose de 2 mg/kg p.c/jour pendant 30 jours a inhibé l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du cortex préfrontal, l'hippocampe et le cervelet.

En revanche Haider et ses collaborateurs (2015) ont montré que l'exposition des rats adultes, pour une seule fois, à trois doses différentes de cadmium (1, 2 et 3 mg/kg) était à l'origine d'une inhibition dose dépendante de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du cerveau. De plus El-Demerdash et ses collaborateurs (2001) ont trouvé que l'exposition des rats adultes par la voie d'ingestion au mercure (2 mg/kg) a été à l'origine de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase aussi bien au niveau du cerveau qu'au niveau du plasma.

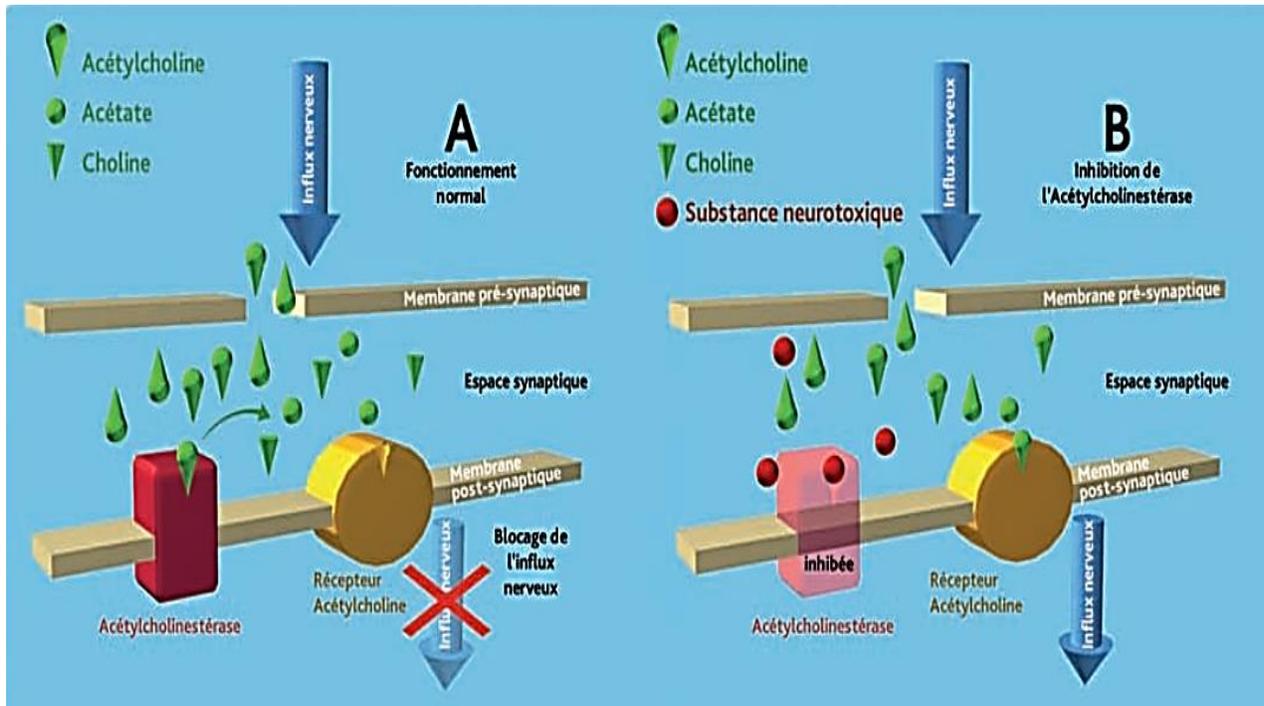


Figure 28 : Mécanisme d'action d'une substance neurotoxique sur la transmission de l'influx nerveux. A : Fonctionnement normal, B : Impact d'une substance neurotoxique inhibant l'acétylcholinestérase (Poisson et *al.*, 2011)

Discussion générale

Ce travail est une contribution à l'évaluation des risques neurotoxiques, provenant de l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1, à un poisson gras contaminé de type «*Anguilla anguilla*», aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL.

Nous avons commencé par l'évaluation de la teneur des anguilles utilisées lors de cette études en chacun des 6 PCB-NDL (PCB n°28, 52, 101, 138, 153 et 180) et en métaux lourds tel que le mercure (Hg), le plomb (Pb) et le cadmium (Cd). Par la suite nous avons enchainé par la réalisation des tests de comportement, qui nous ont permis d'évaluer l'activité générale, la locomotion, l'humeur, ainsi que la capacité de mémorisation et d'apprentissage chez les souris de génération F1, dont les mamans ont été exposées durant les périodes de gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées par une mixture de polluants dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL.

En revanche, nous avons évalué certains marqueurs du stress oxydant, et l'activité de l'acétylcholinestérase, dans trois régions cérébrales (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet), afin de déterminer la sensibilité des différentes zones du cerveau, impliquées dans diverses fonctions étudiées.

Nos résultats ont mis en évidence une hyperactivité motrice, apparu tardivement (JPN195), uniquement chez les souris femelles de génération F1, exposées pendant les périodes gestation et d'allaitement aux anguilles contaminées. Cette hyperactivité motrice est accompagnée par une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase, au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal. Ce résultat est en concordance avec les résultats issus de plusieurs travaux antérieurs (Kuriyama et *al.*, 1991 ; Wood et *al.*, 1991 ; Everitt et *al.*, 1997 ; Viggiano, 2008 ; Ingber et *al.*, 2016) qui ont mis en évidence l'implication des lésions précoces affectant les différentes régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex préfrontal et les systèmes de neurotransmetteurs tel que le système GABAergique, glutaminergique et le système cholinergiques dans l'augmentation de l'activité motrice. En effet Ingber et Pohl (2016) ont mis en évidence, chez la souris, l'existence de fenestres de vulnérabilité du cerveau, pendant les périodes gestationnelle JG 12-14 et lactationnelle JPN 3-10 au cours desquelles l'exposition aux agents toxiques tels que les PCB, le Pb, le MeHg pourrait provoquer une hyperactivité locomotrice. En revanche Wood et ses collaborateurs (1991) ont montré que la lésion de l'hippocampe ventral des rats, au JPN 14, était à l'origine d'une hyperactivité locomotrice, détectée au JPN 35 et qui a persisté jusqu' aux JPN 56 et 86. Cependant

la même lésion réalisée au JPN 3 était à l'origine d'une hyperactivité relevée au JPN 56 et qui a persisté au JPN 86 mais qui n'est pas apparu au JPN 35.

Au cours de cette étude, nous avons relevé que le comportement *dépressif-like* chez les souris mâles traitées durant la période de gestation et d'allaitement par les anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL est accompagné par une perturbation du statut oxydatif au niveau de cortex préfrontal et de l'hippocampe des souris mâle. En effet les résultats des dosages réalisés par spectrophotométrie ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la SOD et de la Cat au niveau de l'hippocampe. De plus, une augmentation significative du taux des protéines carbonylées, au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe, a été enregistré chez les souris mâles, traitées durant la période de gestation et d'allaitement par les anguilles contaminées aux POP dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux dose 216 et 85 ng/kg/j, respectivement. Ce résultat rejoint les résultats de plusieurs travaux antérieurs qui ont montré la perturbation du statut oxydatif chez les patients (Bilici et al, 2001 ; Khanzode et al 2003 ; Herken et al, 2007; Fitzgerald et al, 2008 ;Scapagnini et al., 2012 ; Liu et al., 2015) et chez les animaux (Brocardo et al., 2012; Che et al., 2015) atteints par la dépression.

Plusieurs chercheurs ont montré une augmentation significative de l'activité des enzymes antioxydants (SOD et Cat) chez l'Homme et les animaux atteints par la dépression par rapport aux témoins (Michel et al., 2007 ; Szuster-Ciesielska et al., 2008 ; Che et al., 2015).

La perturbation de l'activité des enzymes antioxydantes, chez les individus atteints par la dépression, pourrait conduire à la production des dommages oxydatifs. En effet plusieurs études épidémiologiques et d'autres réalisées chez les rongeurs ont montré l'augmentation du taux d'oxydation des macromolécules (protéines, lipides, ADN, ARN) chez les individus atteints par la dépressions par rapport au témoins (Yager et al., 2010 ; Bal et al., 2012 ;Brocardo et al. 2012, Che et al., 2015). Brocardo et ses collaborateurs (2012) ont montré que l'exposition gestationnelle (JG1-JG 22) des rats à 4,3 g/kg l'éthanol (36%) pourrait causer l'apparition, chez les animaux traités, des symptômes de dépression et d'anxiété au JPN 59-60, accompagnés d'une augmentation, significative par rapport au témoin, du taux de la peroxydation lipidiques et des protéines oxydées.

En revanche, conformément à nos résultats, plusieurs travaux ont établi des corrélations entre l'atteinte par la dépression et les perturbations affectant le cortex préfrontal et l'hippocampe (Campbell et al., 2004; Michel et al., 2007). Par exemple Selvakumar et ses collaborateurs (2012)

suggèrent que la perturbation de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants suite à l'exposition des rats adultes aux PCB pourrait conduire au dysfonctionnement de l'hippocampe de ses derniers. Nos résultats rejoignent les résultats de ces études antérieures. En effet nous avons montré que l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont la $\Sigma 6$ PCB-NDL a causé une dépression sexe dépendante qui n'a touché que les souris mâles de génération F1. Cette dépression est accompagnée par une perturbation du statut oxydatif au niveau de cortex préfrontal et de l'hippocampe chez les souris mâles. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la maladie de la dépression affecte de nombreuses structures cérébrales (l'hippocampe, le cortex préfrontal, l'amygdale, l'hypothalamus, et le striatum) (Fuchs et al., 2005). Ces structures sont intensivement interconnectées par plusieurs réseaux de neurones et de neurotransmetteurs. Par conséquent la perturbation du fonctionnement de l'une de ces structures telle que l'hippocampe et le cortex préfrontal peut altérer le bon fonctionnement des autres structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'humeur (Fuchs et al., 2005).

Ainsi nous pouvons conclure que la perturbation de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants détectée au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe des souris mâles exposés pendant la période gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées aux POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL est, éventuellement, le précurseur du comportement *dépressive-like*, que nous avons pu observer lors de cette étude. Ce résultat rejoint les résultats obtenus par plusieurs travaux antérieurs. En effet Maximino et ses collaborateurs (2011) ont montré que certains POP habituellement présents dans les matrices alimentaires de type poisson comme les PCB, le mercure et d'autres polluants dangereux pourraient être à l'origine des altérations comportementales, en exerçant un stress oxydant sur le système nerveux central, qui pourrait perturber le métabolisme de la sérotonine. D'autres études épidémiologiques ont suggéré que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) joueraient un rôle important dans les troubles de la dépression majeure (Bilici et al, 2001 ; Khanzode et al 2003 ; Herken et al, 2007; Fitzgerald et al, 2008). De plus Marasco et ses collaborateurs (2013) suggèrent que stress chronique pendant la période de développement pourrait perturber les défenses antioxydantes dans les tissus neuronaux post-mitotiques, en fonction de la région du cerveau.

Les effets observés, sur le comportement, le taux de MDA et des protéines carbonylées, ainsi que sur l'activité des enzymes antioxydantes, et de l'acétylcholinestérase, ont été relevés après quelques semaines (JPN 55) voire plusieurs mois (JPN 195, 200, 366-367) de l'arrêt de l'exposition.

Ces effets seraient éventuellement liés à l'exposition développementale aux molécules neurotoxiques telles que le MeHg, le Pb et les PCB contenues dans la matrice anguille. Les résultats de plusieurs travaux antérieurs (Giordano et Costa, 2012; Semple et *al.*, 2013; Grandjean et Landrigan, 2014) ont montré, que l'exposition développementale aux produits neurotoxiques, pourrait causer la perturbation ou l'altération des processus neurodéveloppementaux tel que la prolifération, la migration, et la différenciation cellulaire, qui contribuent à la formation des structures cérébrales (Semple et *al.* 2013). Toute perturbation de chacun des processus au cours du développement du cerveau peut mener à des troubles de son fonctionnement chez l'adulte ou même à âge avancé. Ces troubles pourraient s'avérer irréversibles et donc persistants car il existe peu de capacité de réparation dans le cerveau adulte (Andersen et *al.*, 2005, Bouayed et *al.*, 2009 ; Grandjean and Landrigan, 2006). Par conséquent, l'exposition précoce aux contaminants de l'anguille (PCB, Pb, Me Hg), aura provoquer des effets irréversibles qui se sont manifesté dans cet étude par le comportement hyperactif chez les souris femelles et dépressif chez les souris mâles.

Les résultats issus des tests de comportement, de l'activité des enzymes antioxydantes, du dosage du taux des protéines oxydés ainsi que ceux obtenus du dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase ont montré que les effets observés provenant de l'exposition gestationnelle et puis lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées ne semblent pas dépendre de la dose de la $\Sigma 6$ PCB-NDL contenu dans l'anguille (matrice alimentaire utilisé dans cette étude). Ceci pourrait être attribué à la contamination des anguilles par les PCB, qui sont classés parmi les perturbateurs endocriniens (PE) (Labouse et *al.*, 2011). Etant donné que les PE sont des substances chimiques d'origine naturelle ou anthropique qui peuvent interférer avec le fonctionnement des glandes endocrines, organes responsables de la sécrétion des hormones. Il est bien démontré que les PE, comme les PCB ne suivent pas le principe classique de la toxicologie qui a fondé la réglementation actuelle des substances chimiques et est résumé dans le paradigme énoncé au 16^{em}e siècle par le médecin-alchimiste Paracelse : « C'est la dose qui fait le poison ». Les perturbateurs endocriniens, comme les PCB, agissent selon un nouveau paradigme synthétisé par l'*Endocrine Society* aux Etats Unis en juin 2009 autour du principe « C'est la période qui fait le poison ». Les effets toxiques des expositions précoces (pendant la gestation et l'allaitement) aux PE se manifestent, pendant l'enfance et à l'âge adulte, voire même sur les générations suivantes. La relation dose-effet n'est pas linéaire et on observe d'une façon générale un effet plus fort à faible dose qu'à forte dose, celui-ci pouvant de plus être amplifié en cas de coexposition (l'effet cocktail),

laquelle correspond à la réalité des expositions humaines. Conformément à cette notion, Elnar et ses collaborateurs (2012) ont montré que l'exposition lactationnelle des souris de génération F1 à la $\Sigma 6$ PCB-NDL à la dose 10 ng/kg a induit une augmentation significative au niveau de l'expression des gènes codant les récepteurs RyR3 dans le cervelet. Cependant aucune différence significative par rapport aux témoins n'a été enregistrée dans l'expression des gènes codants les récepteurs RyR3, au niveau du cervelet chez les souriceaux traités, pendant la période d'allaitement à la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de 1 et 100 ng/kg.

Les résultats issus de ce travail de thèse sont en concordance avec les résultats issus de plusieurs travaux antérieurs. Néanmoins la variabilité des résultats issus de la littérature reflètent des différences et parfois des contradictions qui pourraient être liées à plusieurs facteurs parmi lesquels nous pourrions citer :

- La période d'exposition: pendant la gestation, l'allaitement ou pendant la gestation et l'allaitement ou encore à l'âge adulte,
- La teneur des poissons étudiés en nutriments et en composés toxiques,
- L'âge des individus le jour du test.

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif de ce travail doctoral était l'évaluation, à court, moyen et à long terme, des risques neurotoxiques, liés aux expositions gestationnelle et lactationnelle, chez les souris de génération F1, à un poisson gras de type «*Anguilla anguilla*» contaminé, contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL. Cette démarche avait pour but d'utiliser l'anguille, comme un aliment vecteur de transfert des contaminants chez l'homme tenant en compte sa richesse en oméga 3 et sa capacité d'accumuler des polluants telles que les PCB et les métaux lourds, afin d'évaluer le rapport bénéfice-risque lié à l'exposition précoce, chez les mères gestante et allaitantes aux poissons gras contaminés spécialement par les métaux lourds et les PCB.

Nous avons ainsi évalué les effets neurotoxiques induits par l'exposition, des souris de génération F1, aux anguilles contaminées contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL, durant les premières phases de développement, sur l'activité motrice et locomotrice, la mémoire et l'humeur, aux différents stades de vie des animaux exposés. Nous avons évalué, également le statut oxydatif, au niveau du cortex préfrontal, l'hippocampe et du cervelet, chez les souris exposées via la détermination de l'activité des enzymes antioxydantes (Cat, SOD et GPx), du taux des protéines carbonylées et les lipides oxydés (MDA). L'activité de l'acétylcholinestérase, une enzyme impliquée dans la régulation du taux de l'acétylcholine, un neurotransmetteur jouant un rôle clé dans la régulation de l'activité générale et de la mémoire (Everitt and Robbins, 1997; Taly et al., 2009; Wess et al., 2007), a été évaluée.

L'exposition gestationnelle et lactationnelle des souris de génération F1 aux anguilles contaminées, contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL, n'a pas affecté l'évolution pondérale des souris du JPN0 jusqu'au JPN 330, ni la mémoire de travail, ni la mémoire spéciale de référence et la capacité d'apprentissage. Cependant l'ingestion par les souris femelles des anguilles contaminées, contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL, pendant la période de gestation et d'allaitement, a causé une hyperactivité tardive (apparu au JPN 195), persistante et sexe dépendante et qui ne touche que les souris femelles de la génération F1 (et non pas les mâles) avec un effet « *depressive like* » et qui affecte, seulement, les mâles avec un effet persistant du JPN 55 jusqu'au JPN 337.

Nous pourrions ainsi déduire que l'exposition, durant les premiers stades de développement, des souris de génération F1, aux anguilles contaminées, contenant $\Sigma 6$ PCB-NDL, serait être à l'origine d'altérations comportementales, d'une façon sexe dépendante, à court et à long terme, notamment une hyperactivité, et un effet « *depressive like* » persistants au cours du temps.

L'étude des marqueurs du stress oxydant, au niveau, des trois régions cérébrales (cortex préfrontal, hippocampe et cervelet), prélevées au JPN 338, a révélé une perturbation de l'activité des enzymes antioxydantes. En effet une augmentation significative de l'activité de SOD et de la Cat a été enregistrée, niveau de l'hippocampe des souris mâles dont les mères ont été exposées, durant la période de gestation et d'allaitement, aux anguilles contaminées, contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses de (85, 216 et 400 ng/kg/jour) et (216 et 400 ng/kg/jour), respectivement. Néanmoins, l'exposition gestationnelle et lactationnelle, des souris de génération F1 aux anguilles contaminées contenant $\Sigma 6$ PCB-NDL n'a pas affecté l'activité du GPx, au niveau des trois régions cérébrales étudiées

En revanche, nous avons relevé, une augmentation du taux des protéines carbonylées, au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal des souris mâles, précocement exposés, par des anguilles contenant $\Sigma 6$ PCB-NDL aux doses 85 ng / kg / jour et 216 ng / kg / jour, respectivement. Cependant la consommation par les souris gestantes et puis allaitantes des anguilles contaminées n'avait aucun effet sur le taux de la peroxydation lipidique. En effet il n'y avait aucune différence significative dans le taux du MDA, au niveau des trois régions cérébrales des souris témoins et des souris traitées.

Nous pouvons ainsi conclure que l'exposition gestationnelle et lactationnelle, aux anguilles contaminées, contenant la $\Sigma 6$ PCB-NDL pourrait être incriminée dans la perturbation de la balance anti-oxydants / pro-oxydants, notamment au niveau du cortex préfrontal et hippocampe même à un âge avancé (JPN 338). Ce résultat est en faveur d'une peroxydation générant une cascade des ERO, au niveau des structures cérébrales étudiées qui pourrait être impliqué dans les altérations comportementales que nous avons observé lors de cette étude, et surtout le comportement « *depressive like* ».

L'ingestion par les souris gestantes et puis allaitantes des anguilles contaminées par les POP dont $\Sigma 6$ PCB-NDL, pourrait être à l'origine de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase, au niveau du cortex préfrontal et de l'hippocampe de leurs progéniture, au JPN 338, et par conséquent d'une augmentation du taux de l'acétylcholine au niveau synaptique. Cela pourrait être lié aux perturbations comportementales observées (activité générale et hyperactivité locomotrice).

Ce travail, présente certaines observations originales, qui se manifestent par la combinaison de plusieurs points :

-Le choix d'un aliment fonctionnel, connu pour ses vertus nutritionnelles, mais aussi par sa capacité d'accumuler des polluants et spécialement les PCB, il est connu comme l'un des principaux vecteurs de transfert de ces polluants vers l'Homme.

-La période d'exposition des animaux : la période de développement (gestationnelle et lactationnelle), durant laquelle le système nerveux est très sensible et vulnérable.

-Le suivi du comportement des animaux étudiés aux différents stades de leurs vies : jeune, adulte et âge avancé, pour confirmer la persistance des symptômes apparus.

Au terme de ce travail doctoral nous pourrions conclure que la consommation régulière de matrices alimentaire de types poissons contaminées par les femmes gestantes et puis allaitantes serait un principal vecteur de transfert d'un mélange de contaminants dont les PCB, à leurs progénitures, augmentant ainsi le risque neurotoxique en induisant des altérations neurologiques précoces et persistantes avec des conséquences tardives au fil du temps.

Ce travail de thèse laisse entrevoir de nombreuses perspectives de recherche. En effet, aux vues des résultats obtenus dans cette étude sur les troubles d'activités et du comportement « dépressive like » (*in vivo*), la perturbation de l'homéostasie redox (*in vitro*), sexe dépendante et persistante au fil du temps, il serait pertinent de compléter cette étude par des investigations ciblant le système endocrinien, qui pourrait probablement donner une explication aux perturbations comportementales et moléculaire observés chez les animaux étudiés de façon sexe dépendante. Outre l'étude de l'effet du stress oxydant générés par l'exposition gestationnelle et lactationnelle aux anguilles contaminées sur les lipides et les protéines, il serait aussi intéressant d'étudier les conséquences du stress oxydant sur l'ADN.

Annexes

Annexe 1: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques des PCB pour l'Homme (1/2)

Modèle	Exposition	Principaux résultats	Références
Couples de mères-enfants	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux des PCB dans le cordon ombilical, le lait et le sang maternel ainsi que chez les enfants.	Enfants à l'âge de 4 à 11 ans: Association entre la forte exposition aux PCB en période périnatale et une diminution des scores de QI (QI full-scale et QI verbal)	Jacobson et Jacobson, 1996
Couples de mères-enfants	Estimation de l'exposition par la mesure du taux des PCB n°:118, 138, 153 dans le cordon ombilical, sang maternel	Enfants à l'âge de 3 et 7 mois: Association négative entre l'exposition prénatale aux PCB et les performances des nouveaux nés dans les tests psychomoteurs à 3 mois mais pas à l'âge de 7 mois.	Koo ^o pman- Esseboom et <i>al.</i> , 1996
Couples de mères-enfants	Estimation de l'exposition par la mesure du taux des PCB n°: 138, 153 et 180 dans le cordon ombilical et le lait maternel	Enfants à l'âge de 7 mois: Association négative entre la teneur du lait maternel en PCB et développement mental mais pas le développement moteur	Winnekea et <i>al.</i> , 1998
Couples de mères-enfants	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux des PCB dans le cordon ombilical,	Enfants à l'âge de 38 mois: Association entre la teneur du cordon ombilical en PCB et le déficit mesuré dans le test de Mc Carthy,	Stewart et <i>al.</i> , 2003
Couples de mères-enfants	Estimation de l'exposition par la mesure du taux des PCB n°:118, 138, 153 et 180 dans le cordon ombilical, le lait et le sang maternel	Enfants scolarisés: association entre le taux de PCB est la susceptibilité aux maladies de l'oreille moyenne	Weisglas-Kuperus et <i>al.</i> , 2004

Annexe 1: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques des PCB pour l'Homme (2/2)

Modèle	Exposition	Principaux résultats	Références
Couple mères enfants: 40 femmes enceintes originaires de <u>Nagasaki</u> (Japon)	Exposition environnementale aux PCB n° 74, 99, 118, 126, 138, 146, 153, 156, 163, 170, 177, 178, 180, 183, 187, 194 et 199.	Nourrissons à l'âge de 4 mois: Une association entre l'exposition prénatale aux PCB et l'altération du développement et fonctionnement social.	Doi et <i>al.</i> , 2013
Couples de mères- enfants originaires des pays bas	Evaluation de l'exposition gestationnelle par la mesure, dans le placenta du taux des PCB n°:105, 118, 138, 153, 170, 180, 187, 146, 183, 156. et 6 congénères des métabolites des PCB:4-OH-PCB-107, 30 -OHPCB-153, 40 -OH-PCB-146, 30 -OH-PCB-138, 40 -OH-PCB-187 et 40 - OH-PCB-172.	Nourrissons à l'âge de 3 mois: Aucune association n'est établie entre les mouvements agités et la sommes des PCB et des OH-PCB dosés dans le placenta. -Il y a des associations entre le taux élevés de certains congénères de PCB (PCB-187) et OH-PCB (4-OH-PCB-107) et la diminution du développement moteurs.	Berghuis et <i>al.</i> , 2013
708 personnes, âgés de 60–84 ans	Evaluation de l'exposition environnementale par la mesure, dans le sérum de la somme des 5 PCB-DL (n°: 74, 118, 156, 126 et 169), la somme des 7 PCB-NDL (n°: 99, 138, 146, 153, 170, 180 et 187)	Les personnes âgées de 60-70 ans aucune association entre le taux des PCB dans le sérum et le déclin cognitif n'a été établie Les personnes âgées de 70-84 ans: La forte exposition aux PCB, a été associée à un déclin cognitif plus prononcé.	Bouchard et <i>al.</i> , 2014
Enfants à l'âge de 4 et 5 ans de Nanjing (Chine)	Evaluation de l'exposition par la mesure dans la poussière domestique du taux des PCB n°:1, 2, 3, 4, 9, 6, 8, 19, 18, 16, 25, 28, 22, 52, 44, 71, 67, 74, 66, 56, 99, 87, 110, 82, 147, 146, 153, 179, 138, 187, 174, 177, 173, 180, 198, 203, 195, 194, et 206,	Le test de chi carré a montré que le taux élevé des PCB n°3, 6, 16, 22, 25, 44, 71, 174 et 203 pourrait être associé avec le risque de développement de l'anxiété, la dépression et l'agressivité.	Wang et <i>al.</i> , 2015

Annexe 2: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques des PCB pour l'animal (1/3)

Modèle	Molécule	Exposition	Principaux résultats	Références
Rats	Par voie alimentaire : -Aroclor 1254 -Mélange de PCB mimant la mixture des congénères dans le lait maternel. (RM)	40 mg/kg p.c avant l'accouplement de 50 jours jusqu'à la mise bas.	JPN 0: Une diminution significative de l'activité des aromatasés, dans l'hypothalamus des mâles, exposés durant la lactation, à RM par rapport aux mâles témoins.	Hany et al., 1999
		Exposition lactationnelle	JPN 170: Une diminution significative du taux de testostérone, dans le plasma des mâles, exposés, pendant la lactation à l'aroclure 1245 et à RM	
Rats mâles	Par gavage: PCB n°: 52 ou 153 ou 180.	10 mg/kg p.c aux JPN 8, 14 et 20.	Aux JPN 25-33: Une diminution de l'activité chez les rats traités aux PCB n° 153 et 180.	Johansen et al., 2011
Souris	Par gavage Aroclor 1254	6 et 18 mg/kg p.c/ jour, pendant la période lactationnelle: (JPN 7-JPN 21) et pendant la période post-lactationnelle (JPN 22-JPN42)	JPN35-37: Le test de l'open field: une augmentation du nombre de locomotion, de la fréquence des visites ainsi que du temps passé dans la zone centrale, uniquement chez les souris femelles.	Tian et al.,2011
			JPN 38-39: Le test du labyrinthe surélevé: une augmentation significative du taux d'anxiété uniquement chez les souris mâles traités, par rapport aux témoins.	
			JPN40-41: Le test du labyrinthe Y, Altération de la mémoire de travail et de la cognition, uniquement chez les femelles traités à l'arochlore et pas les mâles	

Annexe 2: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques des PCB pour l'animal (2/3)

Modèle	Molécule	Exposition	Principaux résultats	Références
Souris	Par gavage Σ6 PCB-NDL mimant la mixture des congénères trouvés dans les matrices poissons	1, 10 et 100 ng/kg p.c/j pendant la période postnatale	JPN 7 et 9, Le test de la géotaxie négative: une altération du reflex de réorientation chez les sourceaux femelles traitées à la dose 100 ng/kg p.c.	Elnar et al., 2012
			JPN 14, surexpression du récepteur Ryanodine 3 (RyR3) dans le cervelet de souris traitées à la dose 10ng/kg p.c	
			JPN 28, le test de l'open field, une diminution significative du nombre de locomotion, uniquement chez les souris mâles traités aux doses 1 et 10 ng/kg p.c.	
			JPN 32, le test de l'échappement à l'eau, altération significative de l'intégration visuomotrice chez les le souris mâles traités aux doses 1 et 100 ng/kg p.c.	
			JPN 40-160, le test du labyrinthe surélevé et le test de la chambre claire obscure, une augmentation significative et persistante du taux d'anxiété chez toutes les souris traitées	
Rats	Par voie intraperitoneal Aroclor 1254	50 mg/kg p.c/jour	JPN 90-JPN 120, le test de labyrinthe radial à huit branches: altération touchant les capacités d'apprentissage spatial et la mémoire à long terme des animaux	Selvakumar et al., 2012
			JPN 120, le test de l'open field, une augmentation significative du nombre de locomotion	
			Diminution significative du taux des enzymes: SOD, CAT, GPx, GST et augmentation significative du taux de la peroxydation lipidique au niveau de l'hippocampe.	
			Augmentation significative de la teneur plasmatique en neurotransmetteurs: serotonin, dopamine, epinephrine et norepinephrine	

Annexe 2: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques des PCB pour l'animal (3/3)

Modèle	Molécule	Exposition	Principaux résultats	Références
Souris	PCB 126	0.5 et 1 μ mole/kg p.c/j. 48 heures avant l'accouplement, une fois pendant la gestation et une fois pendant l'allaitement	JPN 49, chez les souris femelles traitées: une diminution significative et dose dépendante du pourcentage de la masse maigre et une augmentations significative du pourcentage de la masse adipeuse par rapport aux souris femelles témoins.	Rashid et <i>al.</i> , 2013
			JPN 49, chez les souris mâles traitées: Une diminution significative du pourcentage de la masse maigre, indépendamment de la dose. Aucun effet du traitement n'a été observé dans le pourcentage de la masse adipeuse.	
Rats spontanément hyperactifs (SHR/NCrI) Rats Wistar Kyoto (WKY/NHsd)	PCB 153	1, 3 ou 6 mg / kg p.c 3 administrations entre JPN 8 et JPN 20	JPN 37-64 -Chez les rats SHR / NCrI, -A la dose de 1 mg / kg p.c : Une atténuation des symptômes de la maladie du Déficit d'attention/ trouble d'hyperactivité, spécialement pour les femelles. -Chez les rats Wistar Kyoto WKY/NHsd), changement du comportement, chez tous les rats traités au PCB et spécialement les mâles par rapport aux rats témoins.	Johansen et <i>al.</i> , 2014
Rats mâles	Par voie alimentaire PCB 47 et PCB 77	12,5 et 25 ppm pendant la période périnatale.	-Aux JPN 14–16, 28–32 et 60–64: Altération de l'activité locomotrice et exploratrice, chez les rats traités aux PCB, dans le test de l'open field.	Krishnan et <i>al.</i> , 2014
Rats	Aroclor 1254	6 mg/kg p.c/ jour, du JG 6 à JPN0	Chez les femelles gestantes: Aux JPN17 et19 diminution significative du taux des T4, par rapport aux témoins, dans le sérum des femelles gestante.	Naveau et <i>al.</i> , 2014
			Chez les nouveaux nés: Aux JPN17 et19, Pas de différence significative, dans la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire, dans les 3 régions cérébrales: rostrale, ventrale et le cortex caudale entre les rats traités et les rats témoins	

Annexe 3: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques de MeHg pour l'Homme (1/2)

Modèle	Molécule	Exposition	Principaux résultats	Références
Couples de mères-enfants des îles de Faroe	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons.	Evaluation de l'exposition prénatale par la mesure du taux du Me Hg dans le cordon ombilical, et dans les cheveux des mères	Enfants âgés de 7 ans: -Association entre l'exposition prénatale à Me Hg et le dysfonctionnement neuropsychologique (langue, mémoire, attention). -Aucune association n'a été établie entre l'exposition prénatale à Me Hg et l'état physiologique	Grandjean et <i>al.</i> , 1997
91 personnes âgées (15-81 ans), habitant du village à proximité de la rivière Tapajos (Un affluent de l'amazone).	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux du Me Hg dans les cheveux des sujets inclus dans l'étude. Me Hg (<50µg/g)	-Altération dose dépendante de la force motrice évaluée par un dynamomètre (évaluant la force de préhension pour les 2 mains) et le test de branches de mouvement alternatifs. -Altérations dose dépendantes des fonctions visuelles, testés en évaluant l'acuité visuelle, la discrimination chromatique.	Lebel et <i>al.</i> , 1998
Couples mères- Enfants (âgés entre 7 et 12 ans) issus de quatre communautés amazoniennes	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux du Me Hg dans les cheveux des mères et leurs enfants. Plus de 80% des enfants inclus dans l'étude ont une concentration de mercure de 10µg/g dans leurs cheveux.	-Une forte corrélation entre le taux de mercure mesurés dans les cheveux des mères et le taux de mercure mesurés chez leurs enfants. -Une association négative entre le taux de mercure dans les cheveux des enfants et les résultats obtenus dans les tests neuropsychologiques, la fonction locomotrice, la performance visuospatiales	Grandjean, et <i>al.</i> , 1999

Annexe 3: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques de MeHg pour l'Homme (2/2)

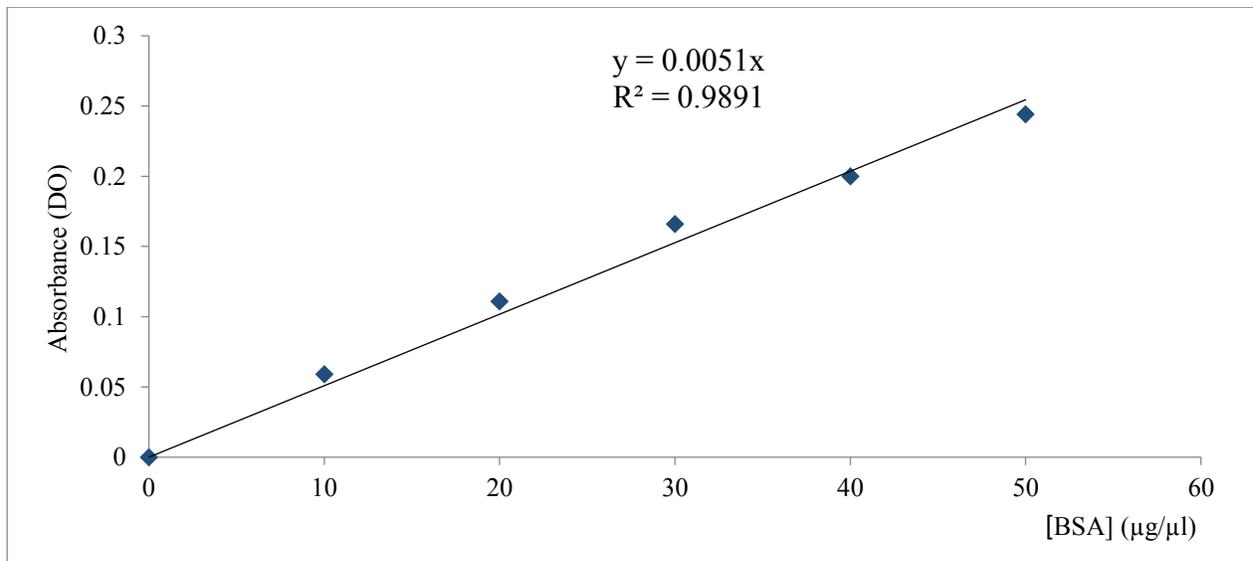
Modèle	Molécule	Exposition	Principaux résultats	Références
378 couples mères-enfants de Guyane (Maroni, Camopi et Awala) ^o	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux de l'Hg dans les cheveux des enfants testés	Chez les enfants 'âgés est entre 9 mois à 6 ans, il y a une relation dose dépendante entre le taux de Me Hg dans les cheveux maternelle et une diminution de la coordination des jambes, diminution de la l'organisation Visio-spatiale et une augmentation des réflexes tendineux	Cordier et <i>al.</i> , 2002
408 couples mères-enfants de la cité de Zhoushan (Chine)	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux de l'Hg dans le cordon ombilical, le sang et les cheveux des sujets testés	Chez les enfants âgés de 3 jours: les taux élevés d'Hg sont associés à une diminution de la capacité comportementale, uniquement, chez les garçons.	Gao et <i>al.</i> , 2007
789 couples mère-enfants du Seychelle	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition par la mesure du taux de l'Hg dans les cheveux des mamans et des enfants inclus dans l'étude.	Chez les enfants à l'âge de 9 et 17ans: une association négative, uniquement chez les garçons, entre le taux de l'exposition postnatale à Me Hg et les résultats des examens du test de rendement régional (SACMEC).	Davidson et <i>al.</i> , 2010
923 enfants à l'âge de 7 ans de l'île de Faroe	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition postnatale par la mesure du taux du Me Hg dans le cordon ombilical, le sang et les cheveux des sujets testés	Association significative entre la teneur du sang en Me Hg et la perturbation de la mémoire visuo-spatiale.	Grandjean et <i>al.</i> , 2014
			Faible association entre la teneur du sang en Me Hg et les performances neuropsychologiques des sujets testés.	
286 enfants eskimos du Quebec arctique (à l'âge scolaire)	Exposition à Me Hg contenu dans les poissons	Evaluation de l'exposition postnatale par la mesure du taux du Me Hg dans le sang du cordon ombilical et du sang veineux.	-Une association négative entre l'exposition prénatale au mercure et le QI	Jacobson et <i>al.</i> , 2015
			Aucune association n'a pu être établie entre l'exposition postnatale au mercure et le QI.	

Annexe 4: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques de MeHg pour l'animal (1/2)

Modèle	Exposition	Principaux résultats	Références
Souris (C57BL/6)	4, 6 et 8 ppm de Me Hg p.c/ jour du JG2 à JPN 21	JPN 63: Le test de l'open field: Diminution de l'activité locomotrice chez les souris traitées.	Goulet et <i>al.</i> , 2003
		JPN70:Le test du T maze modifié: Altération de la mémoire de travail uniquement chez les souris femelle traitées aux doses 6 et 8 ppm	
Souris (ARE- hPAP Tg) transgénique Rétrocoisé à C57BL/6/Bkl	0,5 mg/kg p.c/jour de Me Hg du JG7 à JPN 7	-Le test de la nage forcée: Une prédisposition des souris à la dépression au jeune âge et un à un âge avancé.	Onishchenko et <i>al.</i> , 2007
		Souris à jeune âge et à âge avancé: tests du rotarod et intellicage: -Aucune différence significative dans l'activité motrice et la coordination motrice des souris traités par rapport aux souris témoins.	
		-Souris à jeune âge: Une diminution de l'activité exploratrice, qui touche surtout les souris mâles traités par MeHg .	
		Le test de la piscine de Moriss: Aucun effet du traitement sur la mémoire de rétention sur les souris traitées.	
Souris (C57BL/6)	1.4 µg/g p.c/jour du JG 1 au JG 18	JPN57 à JPN62: Le test du labyrinthe surélevé: Aucun effet n'a été observé sur le taux d'anxiété des souris testés.	Liang et <i>al.</i> , 2009
		JPN63 à JPN82: Test du labyrinthe à bras radiaux: perturbation de la mémoire de travail et des capacités visuelles spatiales.	
Rats (Wistar)	8 mg/kg p.c de Me Hg à JG 7	Rats âgés de 2 mois: Test de l'arène: Augmentation significative de l'activité locomotrice spontanée des rats traités.	Maia et <i>al.</i> , 2009
		Rats âgés de 2 mois : T test de la nage forcée: Augmentation significative du temps d'immobilité chez les rats traités	
		Rats âgés de 2 mois: Test du labyrinthe surélevé: une augmentation significative du taux d'anxiété chez les rats traités.	
Rats Sprague- Dawley r	0.25 mg/kg p.c/ jour du JG 1 à JG 21	Chez les souris femelles sacrifiées à JPN 28: la masse de cerveaux des souris traités à Me Hg est significativement supérieure à celle des témoins	Zulfiah et <i>al.</i> , 2013
		Chez les souris femelles sacrifiées à JPN 28: Augmentation significative du taux des éléments traces: zinc, cuivre, manganèse et sélénium et diminution significative du taux du fer dans le cerveau.	

Annexe 4: Récapitulatif de quelques effets neurotoxiques de MeHg pour l'animal (2/2)

Modèle	Exposition	Principaux résultats	Références
Souris (TK+ et wild-type (WT))	0.59 mg/kg p.c/jour du JG 7 au JPN 7	Aucune différence significative dans le poids corporel des souris traités par rapport aux souris témoins.	Karpova et <i>al.</i> , 2014
		A l'âge de 9 semaines: Test du labyrinthe surélevé: une augmentation significative du taux d'anxiété uniquement chez les souris WT traités.	
		A l'âge de 9 semaines: Test de l'open field: Aucune différence, dans le nombre de locomotion des souris traités par rapport aux témoins.	
		A l'âge de 9 semaines: La piscine de Morris: Une altération de la mémoire spatiale, uniquement, chez les souris WT traités.	
		A l'âge de 9 semaines: Le test de la nage forcée: Une prédisposition à la dépression, uniquement, chez les souris WT traités.	
Rats (Wistar)	4 et 12 μ mol/kg p.c pendant 4 semaines	Diminution significative du poids corporel des rats traités par rapport aux rats témoins.	Liu et <i>al.</i> , 2014
		Diminution significative des marqueurs enzymatiques du stress oxydant chez les rats traités à Me Hg	
		Altération, dose dépendante, de l'ultra structure des neurones au niveau du cortex cérébral.	
Rats (Sprague–Dawley)	2 ppm de Me Hg du JG6 au JPN 21	JPN 29 à JPN30: Le test du rotarod: aucun effet n'a été observé sur la coordination locomotrice.	Zhao et <i>al.</i> , 2014
		JPN34 à JPN 36: Le test de la piscine de Morris: Aucune différence significative entre les rats témoins et les souris traités dans la mémoire de rétention.	
		JPN 3 à JPN21: Test du reflex de redressement: Aucune différence entre les rats témoins et les rats traités.	
		JPN 37: Aucune différence entre les rats témoins et les rats traités dans les marqueurs enzymatiques du stress oxydant, au niveau du cortex cérébral, l'hippocampe, et le cervelet.	



Annexe 5: Gamme étalon, établie pour le dosage de protéines totales, à base de sérum d'albumine bovine (BSA)

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdallah, M.A., Harrad, S. 2014. Polybrominated diphenyl ethers in UK human milk: Implications for infant exposure and relationship to external exposure. *Environment International*. 63: 130-136.

Abou-Donia, M.B., Khan, W.A., Dechkovskaia, A.M., Goldstein, L.B., Bullman, S.L., Abdel-Rahman, A. 2006. In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Archives of Toxicology*. 80:620–631.

ACTA, Association de Coordination Technique Agricole, 2004. Index phytosanitaire, 40ème édition, 804p.

Adgent, M.A. Hoffman, K., Goldman, B. D., Sjödin, A., Daniels J.L. 2014. Brominated flame retardants in breast milk and behavioral and cognitive development at 36 Months. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 28 (1): 48-57.

Afssa. 2004. Avis de l’Afssa relatif à la réévaluation des risques sanitaires du méthylmercure liés à la consommation des produits de la pêche au regard de la nouvelle dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP). 16 mars 2004.

Afssa. Agence Française de sécurité sanitaire des aliments. 2006. Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on the establishment of relevant maximum levels for non dioxin-like polychlorobiphenyls (NDL-PCB) in some foodstuffs Afssa - Request No. 2006-SA-0305. Maisons-Alfort 23 October, 2007.

Ali, N., Shah Eqani, S.A.M.A., Malik, R.N., Neels, H., Covaci, A. 2013. Organohalogenated contaminants (OHCs) in human serum of mothers and children from Pakistan with urban and rural residential settings. *Science of Total Environment*. 461-462: 655–662.

Alivernini, S., Battistelli, C. L., Turrio-Baldassarri, L. 2011. Human Milk as a Vector and an Indicator of Exposure to PCBs and PBDEs: Temporal Trend of Samples Collected in Rome. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*.87(1): 21-25.

Allen RG. 1991. Oxygen reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*. 196:117–29.

Amirad, J. C. 2011. Les risques chimiques environnementaux. Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Ed: TEC & DOC. Paris. ISBN. 978-2-7430-1344-8.775 p.

Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation. 2005. Fiche 3 : Evaluation des risques sanitaires liés au dépassement de la limite de qualité des fluorures dans les eaux destinées à la consommation humaine. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX-Fi-FluorJanvier05.pdf>.

Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation. 2014. Profil toxicologique du toluène (n° CAS 108-88-3) Rapport d’expertise collective. Saisine n°2009-SA-0331. 31p

Arai, T., Otake, T., Tsukamoto K. 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology*. 137, 39-45.

Aschengrau, A., Weinberg, J.M., Janulewicz, P. A., Romano, M. E., Gallagher, L. G., Winter, M. R., Martin, B. R., Vieira, V. M. Webster, T. F., White, R. F., Ozonoff, D. M. 2011. Affinity for risky behaviors following prenatal and early childhood exposure to tetrachloroethylene (PCE)-contaminated drinking water: a retrospective cohort study. *Environmental health*. 10 (102): 1-13.

Aschengrau, A., Weinberg, J.M., Janulewicz, P. A., Romano, M. E., Gallagher, L. G., Winter, M. R., Martin, B. R., Vieira, V. M. Webster, T. F., White, R. F., Ozonoff, D. M. 2012. Occurrence of mental illness following prenatal and early childhood exposure to tetrachloroethylene (PCE)-contaminated drinking water: a retrospective cohort study. *Environmental health*. 11 (2): 1-12.

Aschengrau, A., Winter, M.R., Vieira, V.M., Webster, T. F., Janulewicz, P. A., Gallagher, L. G., Weinberg, J., Ozonoff, D.M. 2015. Long-term health effects of early life exposure to tetrachloroethylene (PCE)-contaminated drinking water: a retrospective cohort study. *Environmental health*. 14 (36): 1-12.

Aschner, M.; Syversen, T., Souza, D.O., Rocha, J.B., Farina, M. 2007. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*..40, 285–291.

Appleton, K. M., Woodside, J.V., Yarnell, J.W.G., Arveiler, D., Haas, B., Amouyel, P., Montaye, M., Ferrières, J., Ruidavets, J.B., Ducimetiere, P., Bingham, A., Evans, A. 2007. Depressed mood and dietary fish intake: direct relationship or indirect relationship as a result of diet and lifestyle? *Journal of Affective Disorders*. 104(1-3):217–223.

Archer, S., Hope, A., Partridge, J.C. 1995. The molecular basis for the green-blue sensitivity shift in the rod visual pigments of the European eels. *Proceedings of the royal Society of London B*. 262: 289- 295.

Arivazhagan, P., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C. 2002. Effect of DL-a-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain regions of aged rats. *Experimental Gerontology* .37:803–811

Arnich, N., Tard, A., Leblanc, J-C., Le Bizec, B., Narbonne, J-F, Maximilien, R. 2009. Dietary intake of non-dioxin-like PCBs in France, impact on maximum levels in some foodstuffs. *Regulatory Pharmacology and Toxicology*. 54: 287-293.

Arnold, G.L., Kirby, R.S., Langendoerfer, S., Wilkins-Haug, L., 1994. Toluene embryopathy: clinical delineation and developmental follow-up. *Pediatrics*. 93: 216–220.

Artacho-Cordón, F., Belhassen, H., Arrebola, J.P., Ghali, R. Amira, D.,Jiménez-Díaz, I., Pérez-Lobato, R., Boussen, H., Hedili A., Olea, N. 2015. Serum levels of persistent organic pollutants and predictors of exposure in Tunisian women. *Science of the total enviroment*. 511: 530-534.

Aston, C., Jiang, L., Sokolov, B.P. 2004. Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *The Journal of Neuroscience Research* .77: 858-866.

Aston, C., Jiang, L., Sokolov, B.P. 2005. Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*. 10: 309-322.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1993. Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine (F). ATSDR/TP-91/17, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

ATSDR, Agency of Toxic Substances and Disease Registry. 2000. Toxicological profile for manganese. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service.

ATSDR. Agency of Toxic Substances and Disease Registry. 2002. Toxicological profile for DDT, DDE and DDD, U.S. Department of health and human services, public health service, Agency for toxic substances and disease registry, 497 p.

ATDSR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007. Toxicological profile for arsenic, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>.

ATDSR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2014. Toxicological profile for tétrachloroéthylène. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 241 pp. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=265&tid=48>.

B

Bakir, F., Damluji, S. F., Amin Zaki I., Murtadha, M, Khalidi, A., Al-Rawi, Y., Tikriti, S. Dhahir, H.I. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 181(4096). 230–241.

Ballschmiter, K., Zell, M. 1980. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Composition of technical Aroclor- and Clophen-PCB mixtures. *Fresenius Zeitung der Analytische Chemie*. 302: 20–31.

Bal, N., Acar, S.T., Yazıcı, A., Yazıcı, K., Tamer, L. 2012. Altered Levels of Malondialdehyde and Vitamin E in Major Depressive Disorder and Generalized Anxiety Disorder. Dusunen Adam: *Journal of Psychiatry & Neurological Sciences*. 25: 206–211.

Barlow, S., Chesson, A., Collins, J.D., Flynn, A., Galli, C.L., Hardy, A., Jany, K-D., Jeger, M-J., Knaap, A., Kuiper, H., Larsen, J-C., Lovell, D., Schlatter, J., Silano, V., Smulders, F., Vannier, P. 2010. Guidance on human health risk-benefit assessment of foods. *EFSA Journal*: 8(7):1673.

Bear, F.B., Connors, B., Paradiso, M.A., 2010. Neurosciences, à la découverte du cerveau. 3ème édition, traduit de Neuroscience: Exploring the Brain, third Edition par Nieoullon A. Editions Pradel.

Belpaire, C., Goemans, G., 2007. Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES Journal of Marine Science*. 64: 1423–1436.

Belzung C. 1999. Measuring rodent exploratory behavior. Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research (techniques in the behavioral and neural sciences, vol. 13). Editors. Crusio WE, Gerlai RT. Elsevier Amsterdam. pp 738-749.

Ben Hassine, S. Hammami, B., Ben Ameer, W., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., El Abidi, R., Driss, M. R. 2013. Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum and their relation with age, gender, and BMI for the general population of Bizerte, Tunisia. *Environmental Science Pollution Research*. 10: 6303-6313.

Berghuis, S. A., Soechitram, S. D., Hitzert, M. M., Sauer, P.J.J., Bos, A. F. 2013. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites is associated with motor development of three-month-old infants. *Neurotoxicology*. 38: 124–130.

Berg, V., Lyche, J.L., Gutleb, A.C., Lie, E., Skaare, J.U., Aleksandersen, M., Ropstad, E. 2010. Distribution of PCB 118 and PCB 153 and hydroxylated PCB metabolites (OH-CBs) in maternal, fetal and lamb tissues of sheep exposed during gestation and lactation. *Chemosphere*. 80(10):1144–1150.

Berk, M., Williams, L.J., Andrezza, A.C., Pasco, J.A., Dodd, S. Jacka, F.N., Moylan, S., Reiner, E.J., Magalhaes, P.V.S. 2014. Pop, heavy metal and the blues: secondary analysis of persistent organic pollutants (POP), heavy metals and depressive symptoms in the NHANES National Epidemiological Survey. *BMJ Open*. 4:e005142. doi:10.1136/bmjopen-2014-00514.

Berger, D.F., Lombardo, J.P., Jeffers, P.M., Hunt, A.E., Bush, B., Casey, A., Quimby, F. 2001. Hyperactivity and impulsiveness in rats fed diets supplemented with either Aroclor 1248 or PCB-contaminated St. Lawrence river fish. *Behavioural. Brain Research*. 126, 1–11.

Bergkvist, C., Akesson, A., Glynn, A., Michaëlsson, K., Rantakokko, P., Kiviranta, H., Wolk, A., Berglund, M. 2012. Validation of questionnaire-based long-term dietary exposure to polychlorinated biphenyls using biomarkers. *Molecular Nutrition and Food Research*. 56: 1748-54.

Bertin, L. 1951. Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses. Paris, Payot, 188 p.

Belzung C. 1999. Measuring rodent exploratory behaviour. In Crusio WE, Gerlai, R.T., editors. Handbook of molecular genetic techniques for brain behavioral research (techniques in the behavioral and neural sciences. Vol 13) Amsterdam: Elsevier.: 738-749.

Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M.A., Uydu, H.A., Bekaroglu, M., Deger, O. 2001. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorder*. 64: 43-51.

Bjermo, S., Darnerud, P.O., Lignell S., Pearson, M., Rantakokko P., Nälsén, C., Enghardt Barbieri, H., Kiviranta, H., Lindroos A.K., Glynn, A. 2013. Fish intake and breastfeeding time are associated with serum concentrations of organochlorines in a Swedish population. *Environment International*. 51: 88-96.

- Blanchet Letrouve, I., Zalouk Vergnoux, A., Venisseau, A., Couderc, M., Le Bizec, B., Elie, P., Herrenknecht, C., Mouneyrac, C., Poirier, L. 2014.** Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: spatial and biological variabilities. *Science of the total environment*. 472: 562 - 571.
- Bloom, B., Cohen, R.A., Freeman, G. 2010.** Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2009. *Vital and Health Statistics Series*. 10: 1–82.
- Boëtius, I., Boëtius, J. 1980.** Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana*. 1: 1–28.
- Boëtius, I., Boëtius, J. 1985.** Lipid and protein content in *Anguilla anguilla* during growth and starvation. *Dana*. 4, 1-17.
- Boix, J., Cauli, O., Felipo, V. 2010.** Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. Mechanisms involved. *Neuroscience* 167: 994–1003.
- Borja, J., Taleon, D.M., Auresenia, J. and Gallardo, S., 2005.** Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry*, 40(6): 1999-2013.
- Bossy, A., Pham-Delègue, M.H., Baudoin, C. 2009.** Ethologie appliquée. Comportement animaux et humains, questions de société. Ed : Quae. ISBN : 978-2-7592-0191-4. 250p.
- Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A.K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G., Soulimani, R. 2009.** Effects of lactational exposure to benzo[alpha] pyrene (B[alpha]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology*. 59(3):97-106.
- Bouayed, j. and Bohn, T. 2010.** Exogenous antioxidants. Double-edged swords in cellular redox state Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3(4) 228-237.
- Bouchard, M.F., Oulhote, Y., Sagiv, S.K., Saint-Amour, D., Weuve, J. 2014.** Polychlorinated biphenyl exposures and cognition in older U.S. adults: NHANES (1999–2002). *Environmental Health Perspectives*. 122: 73–78.
- Boucher, O., Muckle, G., Bastien, C.H. 2009.** Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: a neuropsychologic analysis. *Environmental Health Perspectives*. 117: 7–16.
- Boucher, O., Muckle, G., Jacobson, J.L., Carter, R.C., Kaplan-Estrin, M., Ayotte, P., Dewailly, E., Jacobson, S.W. 2014.** Domain-specific effects of prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead on infant cognition: Results from

the environmental contaminants and child development study in Nunavik. *Environmental Health Perspectives*. 122:310–316.

Bountziouka V, Polychronopoulos E, Zeimbekis A, Papavenetiou, E., Ladoukaki, E., Papairakleous, N., Gotsis, E., Metallinos, G., Lionis, C. 2009. Long-term fish intake is associated with less severe depressive symptoms among elderly men and women: the MEDIS (MEDiterranean ISlands Elderly) epidemiological study. *Journal of Aging and Health*. 21(6):864–880.

Bouwman H., Kylin, H. Sereda B., Bornman R. 2012. High levels of DDT in breast milk: Intake, risk, lactation duration, and involvement of gender. *Environmental pollution*. 170: 63-70.

Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*. 128: 617-630.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72: 248-254.

Braquenier, J.B., Quertemont, E., Tirelli, E., Plumier, J.C. 2010. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicology and Teratology*: 32:234–239.

Brocardo, P.S, Boehme, F., Patten, A., Cox, A., Gil-Mohapel, J., Christie, B.R. 2012. Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. *Neuropharmacology*. 62 (4): 1607–1618.

Brown, A.P., Olivero-Verbel, J., Holdan,W.L., Ganey, P.E., 1998. Neutrophil activation by polychlorinated biphenyls: structure–activity relationship. *Toxicological sciences*. 46: 308–316.

Budavari, S. 1989. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 11^{eme} edition. Merck & Co., Rahway, NJ. 8565 pp.

Buratovic, S., Viberg, H., Fredriksson, A., Eriksson, P.2014. Developmental exposure to the polybrominated diphenyl ether PBDE 209: Neurobehavioural and neuroprotein analysis in adult male and female mice. 38 (2): 570-585.

Bushnell, P.J., Moser, V.C., Samsam, T.E. 2001. Comparing cognitive and screening tests for neurotoxicity. Effects of acute chlorpyrifos on visual signal detection and a neurobehavioral test battery in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 23(1):33–44.

- Canfield, R.L., Henderson, C.R., Cory-Slechta, D.A., Cox, C., Jusko, T.A., Lanphear, B.P. 2003.** Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg/dL. *The New England Journal of Medicine*. 112: 1308–1313.
- Carmalt, C. J., Norman N. C. 1998.** Arsenic, Antimony and Bismuth: some general properties and aspects of periodicity. *Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. N. C. Norman, Thomson Science.
- Cauli, O., Piedrafita, B., Llansola, M., Felipo, V., 2012.** Gender differential effects of developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its combinations on motor activity and coordination. *Toxicology*. 311(1-2), 61–68.
- Chakraborti D., Hussam A., Alauddin M. 2003(a).** Arsenic: environmental and health aspects with special reference to groundwater in South Asia. Foreword. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*. 38 (1):11-15.
- Chakraborti D., Mukherjee S.C., Saha K.C., Chowdhury U.K., Rahman M.M., Sengupta M.K. 2003(b).** Arsenic toxicity from homeopathic treatment. *Journal of toxicology. Clinical toxicology* 41(7): 963-967.
- Che, Y., Zhou, Z., Shu, Y., Zhai, C., Zhu, Y., Gong, S., Cui, Y., Wang, J.F. 2015.** Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neuroscience letters*. 584. 208-213.
- Chen, Y.C., Yu, M.L., Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hsu, C.C., 1994.** A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *American Journal of Public Health*. 84: 415–421.
- Chen, A., Yolton, K., Rauch, S.A., Webster, G. M., Hornung, R., Sjödin, A., Dietrich, K. N., Lanphear B.P. 2014.** Prenatal Polybrominated Diphenyl Ether Exposures and Neurodevelopment in U.S. Children through 5 Years of Age: The HOME Study. *Environmental health perspectives*. 122 (8): 856-862
- Choi, A. L., Sun, G., Zhang, Y Grandjean, P. 2012.** Developmental Fluoride Neurotoxicity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environmental Health Perspectives*. 120: 1362–1368.
- Christiansson, A., Eriksson, J., Teclechiel, D. Bergman, A. 2009.** Identification and quantification of products formed via photolysis of decabromodiphenyl ether. *Environmental Science and Pollution Research*. 16: 312-321.
- Chrysohoou, C., Tsitsinakis, G., Siassos, G., Psaltopoulou, T., Galiatsatos, N., Metaxa, V., Lazaros, G., Miliou, A., Giakoumi, E., Mylonakis C., Zaromytidou, M., Economou, E., Triantafyllou, G., Pitsavos, C., Stefanadis, C. 2011.** Fish consumption moderates depressive symptomatology in elderly men and women from the IKARIA Study. *Cardiology Research Practice*. Doi: 10.4061/2011/219578

CIV. 2008. Centre d'information des viandes. Résidus et contaminants chimiques des viandes les connaître et les maîtriser. Cahier de Sécurité des Aliments, CIV, Octobre 2008; 1- 33.

Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald RA, editor. CRC handbook of methods in oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Colciago A, Casati L, Mornati O, Vergoni AV, Santagostino A, Celotti F, Negri-Cesi P. 2009. Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat. Part 2: effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5alpha-reductases in the offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 239 (1): 46–54.

Cordier, S., Garel, M., Mandereau, L., Morcel, H., Doineau, P., Gosme-Seguret, S., Josse, D., White, R., Miel-Tison, C., 2002. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environmental Research*. 89: 1–11.

Cory-Slechta D.A. 2003. Lead-induced impairments in complex cognitive function: offerings from experimental studies. *Child Neuropsychology*. 9: 54-75.

COSSAD., 1999. La dynamique du mercure, IFREMER, Région Haute Normandie, (Programme scientifique Seine-Aval), 11- 25.

Costa, L.G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., Soldin, O.P. 2004. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44:87-110.

Cotton, F.A. et Wilkinson, G. 1988. Advanced inorganic chemistry. John Wiley & Sons, New York, NY. 546 pp.

Couper, J. 1837. On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *British Annals of Medicine and Pharmacology*. 1: 41–42.

Cullen, W. R., K. J. Reimer. 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89(4): 713-764.

Crawford, M.A., 1993. The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57, 703S–710S.

Crepeaux, G. 2012. Exposition périnatale à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez le rat : Evaluation des effets neurotoxiques à court et à long terme. *Université de Lorraine*. 388p.

D

D-A-CH (Deutsche Gesellschaft für Ernährung - Österreichische Gesellschaft für Ernährung Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung - Schweizerische Vereinigung für Ernährung). 2013. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Neuer Umschau Buchverlag, Frankfurt/Main, Germany. 292 p.

Dam, K., Seidler, F.J., Slotkin, T.A. 2000. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Developmental Brain Research*. 121:179–187.

Dangour, A.D., Uauy, R., 2008. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac. Journal of clinical. Nutrition*. 17(S1), 185–188.

Davidson, P.W., Leste, A., Benstrong, E., Burns, C.M., Valentin, J., Sloane-Reeves, J., Huang, L.S., Miller, W.A., Gunzler, D., van, W.E., Watson, G.E., Zareba, G., Shamlaye, C.F., Myers, G.J. 2010. Fish consumption, mercury exposure, and their associations with scholastic achievement in the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology*. 31, 439–447.

Degani, G., Hahamu, H., Levanon, D. 1986. The relationship of the eel *Anguilla anguilla* (L.) body size, lipid, protein, glucose, ash, moisture composition and enzyme activity (aldolase). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 86A(4), 739-745.

Dekker, W. 2000. The fractal geometry of the European eel stock. *Journal of Marine Science*. 57:109-121.

DH (Department of Health), 1991. Dietary Reference Values for food energy and nutrients for the United Kingdom. Report of the Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy. HMSO, London, UK, 212 p.

Debes, F., Weihe, P., Grandjean, P. 2015. Cognitive deficits at age 22 years associated with prenatal exposure to methylmercury. *Cortex*. doi: 10.1016/j.cortex.2015.05.017.

Dekker. 2002. Monitoring of glass eel recruitment: volume 1 thematic overview. Volume 2A: country reports northern part. Volume 2B: country reports southern part. C007/02-WD. IJmuiden, pp 256.

Di Leo A, Cardellicchio N, Giandomenico S, Spada L. 2010. Mercury and methylmercury contamination in *Mytilus galloprovincialis* from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy): risk evaluation for consumers. *Food Chemical Toxicology*. 48 (11):3131-6.

de Souza Lisboa, S.F., Gonçalves, G., Komatsu, F., Queiroz, C.A., Almeida, A.A., Moreira, E.G. 2005. Developmental lead exposure induces depressive-like behavior in female rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 28 (1): 67-77.

Doi, H., Nishitani, S., Fujisawa, T.X., Nagai, T., Kakeyama, M., Maeda, T., Shinohara, K. 2013. Prenatal Exposure to a Polychlorinated Biphenyl (PCB) Congener Influences Fixation Duration on Biological Motion at 4-Months-Old: A Preliminary Study. *PLoS ONE*. 8(3): e59196. doi:10.1371/journal.pone.0059196.

Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. 2001. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. III: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environmental Health Perspectives*. 109 (1): 101–111.

Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thomé, J.-P., Eppe, G., Soulimani, R., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutrition Research*. 34(12): 1075-1084.

Dufour, S., Burzawa-Gérard, E., Le Belle, N., Sbaihi, M., Vidal, B. 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K. (eds) : Eel biology. Tokyo, Springer., 373-383.

Durif, C., Elie, P., Dufour, S., Marchelidon, J., Vidal, B. 2000. Analyse des paramètres morphologiques et physiologiques lors de la préparation à la migration de dévalaison chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) du lac de Grand-Lieu (Loire-Atlantique). *Cybium*. 24(3), 63-74.

Durif, C., Dufour, S., Elie, P. 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla* : a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology*. 66: 1025-108.

E

Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., Spencer, P.S. 2008. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*. 38 (2):1–125.

Edgar, N., Sibille, E. 2012. A putative functional role for oligodendrocytes in mood regulation. *Translational Psychiatry*. doi:10.1038/tp.2012.34.

EDIALUX, 2002. Fiche de données de sécurité : Nom du produit: EMPIRE* 200 INSECTICIDE, 7 p (<http://www.edialux.be/fr/vf/Fds%20Empire.pdf>).

EFSA, European food safety authority. 2005. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food. *EFSA Journal*. 284: 1–137.

EFSA, European Food Safety Authority. 2006. Risk-benefit analysis of foods: methods and approaches. *In*: EFSA Colloquium 6: Risk-benefit analysis of foods: methods and approaches, 13-14 July 2006. Tabiano (province of Parma), Italy.

EFSA. European Food Safety Authority. 2008. Safety of aluminium from dietary intake. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). *The EFSA Journal*. 754:1-34.

EFSA .European Food Safety Authority. 2009. Guidance of the Scientific Committee on Use of the benchmark dose approach in risk assessment. *The EFSA Journal*. 1150: 1-72.

EFSA. European Food Safety Authority. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) 2010. Scientific Opinion on Lead in Food. *The EFSA Journal*, 8(4): 1-147.

EFSA. European Food Safety Authority. 2011. Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. *The EFSA Journal*. 9(5):2156

EFSA. European Food Safety Authority. 2012 (a). Modification of the existing MRLs for chlorpyrifos in various crops and in products of animal origin. *The EFSA Journal*. 10(1): 1-83.

EFSA, European Food Safety Authority, 2012 (b). Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. *The EFSA Journal*. 10: 28–32.

EFSA. European Food Safety Authority. 2013 (a). Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential of acetamiprid and imidacloprid. *EFSA Journal*. 11(12): 1-47.

EFSA. European Food Safety Authority. 2013 (b). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride
EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). *EFSA Journal*. 11(8):3332

EFSA. European Food Safety Authority. 2014 (a). Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. European Food Safety Authority. *EFSA Journal*. 12(3): 1-60.

EFSA. European Food Safety Authority. 2014 (b). Conclusion on pesticide peer review. Conclusion on the peer review of the pesticide human health risk assessment of the active substance chlorpyrifos. *EFSA Journal*. 12(4):1-34.

EFSA. European Food Safety Authority. 2014 (c). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. *EFSA Journal*: 12(3): 1-257.

EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Committee, 2015. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal*. 13(1):3982, 36 pp.

Eguchi, A., Nomiya, K., Tue, N.M. Trang, P.T. Viet, P.H., Takahashi, S., Tanabe, S. 2015. Residue profiles of organohalogen compounds in human serum from e-waste recycling sites in North Vietnam: Association with thyroid hormone levels. *Environmental Research*. 137, 440–449.

El-Demerdash, F.M. 2011. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. *Journal of environmental science and health. Part B*. 36(4), 489–499.

Elie, P. 1979. Contribution à l'étude des montées de civelles d'*Anguilla anguilla* Linné (Poisson, Téléostéen, Anguilliforme), dans l'estuaire de la Loire : pêche, écologie, écophysiologie et élevage. Travaux de thèse soutenue à l'Université Rennes I., 381 pp.

Elie, P., Lecomte-Finiger, R., Cantrelle, I., Charlon, N. 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla*. *Vie Milieu*. 32(3), 149-157.

Elie, P., Rochard, E. 1994. Migration des civelles d'anguilles (*Anguilla anguilla*) dans les estuaires, modalités du phénomène et caractéristiques des individus. Analyse de la littérature. *Bulletin Français de la Pêche et la Pisciculture*. 335, 81-98.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88–95.

Elnar, A.A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A.K., Soulimani, R., 2012. Neurodevelopmental and behavioral toxicity of lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (Σ 6 NDL-PCBs) in offspring mice. *Toxicology*. 299: 44–54.

Ennaceur S., Gandoura N., Driss M.R. 2008. Distribution of polychlorinated biphenyl levels measured in delivering women from different location in Tunisia. Levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. *Environmental Research*. 108: 86-93.

Environnement-Canada. 1988. La maîtrise des PCB contenus dans le matériel électrique. Centre d'édition du gouvernement canadien, 3^{ème} édition.

Ennaceur, S., Driss, M.R. 2010. Serum organochlorine pesticide and organochlorinated biphenyl levels measured in delivering women from different locations in Tunisia. *International journal environmental analytical chemistry*. 90:821-828.

Eriksson, P., Fredriksson, A., 1996. Developmental neurotoxicity of four ortho-substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. L155–165.

Erikson, K. M., Aschner, M. 2003. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International*.43: 475–480.

Eriksson J, Green N, Marsh G and Bergman A. 2004. Photochemical decomposition of 15 polybrominated diphenyl ether congeners in methanol/water. *Environmental Science & Technology*. 38: 3119-3125.

Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, Morga N, Jewell NP. 2007. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environmental Health Perspectives*. 115:792–798.

Ethier, A. A., Muckle, G., Jacobson, S. W., Ayotte, P., Jacobson, A. J. Saint-Amour, D. 2015. Assessing new dimensions of attentional functions in children prenatally exposed to environmental contaminants using an adapted Posner paradigm. *Neurotoxicology and Teratology*. doi: 10.1016/j.ntt.2015.07.005

EU. Commission Regulation (EU) No. 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for Dioxins, Dioxin-Like PCBs and Non Dioxin-Like PCBs in foodstuffs. European Commission, Brussels, Belgium 2011.

Everitt, B.J., Robbins, T.W., 1997. Central cholinergic systems and cognition. *Annual Review of Psychology*. 48, 649–684.

F

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2004. Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956-2003). ILSI Press International Life Sciences Institute.

FAO/WHO, Joint Secretariat to JECFA. 2013. Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), 7/1/2013. *FAO Roster of experts for JECFA (2012-2016)*. 1-7.

Ferrante, M.C., Clausi, M.T., Meli, R., Fusco, G., Naccari, C., Lucisano, A. 2010. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). *Chemosphere*. 78 (6): 709-716.

Ferrey, B.; Gervasoni, D., Vogt, C. 2012. Précis de neurochirurgie stéréotaxique appliquée aux rongeurs de laboratoire. Ed: Tec &Doc. ISBN: 978-2-7430-1459-2.

Fincher R.M., Koerker R.M. 1987. Long-term survival in acute arsenic encephalopathy. Follow-up using newer measures of electrophysiologic parameters. *American Journal of Medecine.* 82(3) 549-552.

Fitzgerald, E.F., Belanger, E.E., Gomez, M.I., Cayo, M., Mc Caffrey, R.J., Seegal, R.F., Jansing, R.L., Hwang, S., Hicks, H.E. 2008. Polychlorinated biphenyl exposure and neuropsychological status among older residents of upper Hudson river communities. *Environmental Health Perspectives.* 116: 209–15.

Flohe, L., Gunzler, W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology.* 105: 114–121.

Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D. 2004. Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications 2000-2003. *Analyst.* 129(5): 373-395.

Fontaine, Y.-A., Pizam, M., Le Moal, C., Rambourg, A. 1995. Silvering and gill “mitochondria-rich” cells in the eel, *Anguilla anguilla.* *Cell and tissue Research.* 281, 465-471.

Frome, H., Albrecht, M., Appel, M., Hilger, B., Völkel, W., Liebl, B., Roscher, E. 2015. PCBs, PCDD/Fs, and PBDEs in blood samples of a rural population in South Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 218 (1): 41–46.

Franco, J. L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dickson, P.W. Mattos, J.J. Martins, R., Bairy, A. C.D., Marques, M.R., Dafre, A.L., Farina, M. 2009. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radical Biology & Medicine.* 47: 449-457.

Fuchs, E., Czeha, B., Kolea, M.H.P., Michaelise , T., Lucassend, P.J. 2005. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. *European Neuropsychopharmacology.* 14: S481-S490.

G

Gao, Y., Yan, C.H., Tian, Y., Wang, Y., Xie, H.F., Zhou, X., Yu, X.D., Yu, X.G., Tong, S., Zhou, Q.X., Shen, X.M., 2007. Prenatal exposure to mercury and neurobehavioral development of neonates in Zhoushan City, China. *Environmental Research.* 105: 390–399.

- Garcia, D. A., Saavedra, L. C .A., Hernandez, A. J., Loera, M. J., Aranda, E. S.C. 2016.** Early Developmental Low-Dose Methylmercury Exposure Alters Learning and Memory in Periadolescent but Not Young Adult Rats. *BioMed Research International*. doi.org/10.1155/2016/6532108
- Getz, K. D., Janulewicz, P. A., Rowe, S., Weinberg, J. M., Winter, M. R., Martin, B. R., Vieira, V. M., White, R. F., Aschengrau A. 2012.** Prenatal and Early Childhood Exposure to Tetrachloroethylene and Adult Vision. *Environmental health perspectives*. 120 (9): 1327–1332.
- Geier, C. F., Garver, K., Terwilliger, R., Luna, B. 2009.** Development of Working Memory Maintenance. *Journal of Neurophysiology* 101: 84 –99.
- Giordano, G., Costa, L.G. 2012.** Developmental Neurotoxicity: Some Old and New Issues. *International Scholarly Research Network Toxicology*. doi:10.5402/2012/814795.
- Gladen, B.C., Rogan, W.J. 1991.** Effects of perinatal polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene on later development. *Journal of Pediatrics*. 119:58–63.
- Gómara, B., Athanasiadou, M., Quintanilla-López, J. E., González, M. J., Bergman, A. 2011.** Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites in placenta from Madrid mothers. *Environmental Science and Pollution Research*. 19 (1): 139-147.
- Gottschalk, L.A., Rebello, T., Buchsbaum, M.S., Tucker, H.G., Hodges, E.L.1991.** Abnormalities in hair trace elements as indicators of aberrant behavior. *Comprehensive Psychiatry* 32:229-237.
- Gouin, T. et Harner, T. 2003.** Modelling the environmental fate of polybrominated diphenyl ethers. *Environment International*. 29: 717-724.
- Goulet, S., Dore, F.Y., Mirault, M.E. 2003.** Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicology and Teratology*. 25:335–47.
- Gouzy, A., Farret, R. and Le Gall, A.C., 2005.** Détermination des pesticides à surveiller dans le compartiment aérien: approche par hiérarchisation, Rapport INERIS n° DRC – 05 – 45936 – 95.
- Grandjean, P., Landrigan, P.J. 2006.** Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*. 368: 2167–78.
- Grandjean, P. and Herz, K. T. 2011.** Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans, *Mount Sinai Journal of Medicine*, 78(1): 107–11.

Grandjean, P., Landrigan, P.J. 2014. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurology*. 13: 330-338.

Grotto, D., Valentini, J., Serpeloni, J.M. Ponte Monteiro, P.A., Latorraca, E.F., Santos de Oliveira, R., Gregg Antunes, L. M., Cristina Garcia, S., Barbosa Jr, F. 2011. Evaluation of toxic effects of a diet containing fish contaminated with methylmercury in rats mimicking the exposure in the Amazon riverside population. *Environmental Research*. 111: 1074–1082.

Grumetto, L., Ortosecco, G., Russo, G., Guida, M., Ferranti, P., Nasi, A., Barbato, F. 2015. Dioxin-like PCB levels in maternal and umbilical cord sera of people living near dump sites in southern Italy: a pilot study of biomonitoring. *Environmental Monitoring Assessment*. 10.1007/s10661-015-4267-2.

H

Haider, S., Saleem, S., Tabassum, S., Khaliq, S., Shamim, S., Batool, Z., Parveen, T., Inam, Q., Haleem, D. J. 2013. Alteration in plasma corticosterone levels following long term oral administration of lead produces depression like symptoms in rats. *Metabolic Brain Disease*. 28:85-92.

Haider, S., Anis, L., Batool, Z., Sajid, I., Naqvi, F., Khaliq, S., Shoaib, A. 2015. Short term cadmium administration dose dependently elicits immediate biochemical, neurochemical and neurobehavioral dysfunction in male rats. *Metabolic brain diseases*.30 (1): 83-92.

Halliwell BaG, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine: *Oxford University Press*.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edition; Clarendon Press, Oxford.

Hall, C.S., Ballachey, E.L. 1932. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*. 6: 1–12.

Harada, M. 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*. 25:(1)1–24.

Hany, J., Lilienthal, H., Sarasin, A., Roth-Ha`rer, A., Fastabend, A., Dunemann, L., Lichtensteiger, W., Winneke, G. 1999. Developmental Exposure of Rats to a Reconstituted PCB Mixture or Aroclor 1254: Effects on Organ Weights, Aromatase Activity, Sex Hormone Levels, and Sweet Preference Behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology* 158, 231–243.

Harrad, S., Smith, D., 1999. Eel consumption as a pathway of human exposure to PCBs. *International journal of environmental health research*. 9:31-37.

Haviland, J.A., Butz, D.E., Porter, W.P. 2010. Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. *Reproductive Toxicology*. 29:74–79.

He, P., Wang, A.G., Xia, T., Gao, P., Niu, Q., Guo, L.J., Chen, X.M. 2009. Mechanisms underlying the developmental neurotoxic effect of PBDE-47 and the enhanced toxicity associated with its combination with PCB153 in rats. *Neurotoxicology*. 30: 1088-1095.

Herbstman, J.B.; Mall, J.K. 2014. Developmental exposure to polybrominated diphenyl ethers and Neurodevelopment. *Environmental health reports*. 1(2): 101-112.

Herken, H., Gurel, A., Selek, S., Armutcu, F., Eren Ozen, M., Bulut, M., Kap, O., Yumru, M., Asuman Savas, H., Aky, O. 2007. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: Impact of antidepressant treatment. *Arctic Medical Research*. 38: 247-252.

Hibbeln, J.R. 1998. Fish consumption and major depression [letter]. *Lancet*. 351(9110):1213.

Hughes, R.N., 2004. The value of spontaneous alteration behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigation of memory. *Neurosciences & Technology*. 38: 945-956.

I

IARC. 1974. Some Organochlorine Pesticides. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.

IARC. 1979. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals in humans. Tetrachloroethylene. Lyon, France: World Health Organization, 20:491-514.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 1989. Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting. Toluene. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volume 47. Lyon, France.

IARC. International Agency for Research on Cancer. 2006. Inorganic and Organic Lead Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. 87, 519.

IARC. 2013. Agents classified by the IARC monographs. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. Volume 1-7. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. April 24, 2013.

INERIS, 2006. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. Le chlorpyrifos.

INERIS. 2010. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Arsenic et ses dérivés inorganiques. 124 p.

INERIS, 2011(a). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: Les polychlorobiphenyles (PCB), DRC-11-118962-11081A. 89 p.

INERIS, 2012. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: Le Manganèse. DRC-11-117259-10310B. 81p.

Icenogle, L.M., Christopher, N.C., Blackwelder, W.P., Caldwell, D.P., Qiao, D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., Levin, E.D. 2004. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology and Teratology*. 26:95–101.

Ingber, S., Pohl, H. 2016. Windows of sensitivity to toxic chemicals in the motor effects development. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.11.018.

IOM (Institute of Medicine). 2001. Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Food and Nutrition Board. National Academy Press, Washington, D.C., USA. 797 p.

J

Jacobson, S.W., Fein, G.G., Jacobson, J.L., Schwartz, P.M., Dowler, J.K.. 1985. The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Development*. 56:853-860.

Jacobson, J.L., Jacobson, S. 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *The new England journal of medicine*. 355 (11):783-789.

Jacobson, J. L., Muckle, G., Ayotte, P., Dewailly, E., Jacobson, S. W. 2015. Relation of Prenatal Methylmercury Exposure from Environmental Sources to Childhood IQ. *Environmental health perspectives*. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1408554>.

Jensen, S. 1966. Report of a new chemical hazard. *New Scientist* 32: 612.

Jensen, A.A., Slorach, S.A. 1991. Factors affecting the levels of residues in human milk. In *Chemical contaminants in human milk* (Jensen A.A., Slorach, S.A., eds). Pp199-208. CRC Press, Boca Raton, FL.

Johansen, E.B., Fonnum, F., Lausund, P.L., Walaas, S., Bærland, N.E., Wøien, G., Sagvolden, T. 2014. Behavioral changes following PCB 153 exposure in the Spontaneously Hypertensive rat – an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity disorder. *Behavioral and Brain Functions*.10: 2-19.

John Jake, R., Dorothea F. K. R. 2014. The brominated flame retardants, PBDEs and HBCD, in Canadian human milk samples collected from 1992 to 2005; concentrations and trends. *Environment International*. 70: 1-8.

Johansen, E.B., Knoff, M., Fonnum, F., Lausund, P.L., Walaas, S.I., Wøien, G., Sagvolden, T. 2011. Postnatal exposure to PCB 153 and PCB 180, but not to PCB 52, produces changes in activity level and stimulus control in outbred male Wistar Kyoto rats. *Behavioral and Brain Functions*. 7 (18): 2-11.

Johnson, F.O., Chambers, J.E., Nail, C.A., Givaruangawat, S., Carr, R.L. 2009. Developmental chlorpyrifos and methyl parathion exposure alters radial-arm maze performance in juvenile and adult rats. *Toxicological Sciences*. 109:132–142.

Jones, H.E., Balster, R.L., 1998. Inhalant abuse in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*. 25, 153–167.

K

Karpova, N.N., Lindholm, J.S., Kuleskaya, N., Onishchenko, N., Vahter, M., Popova, D., Ceccatelli, S., Castrén, E. 2014. TrkB overexpression in mice buffers against memory deficits and depression-like behavior but not all anxiety- and stress-related symptoms induced by developmental exposure to methylmercury. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8 (315): 1-12

Kawamura R, Ikuta H, Fukuzumi S, Yamada, R., Tsubaki, S., Kodama, T. Kurata, S.. 1941. Intoxication by manganese in well water. *The Kitasato Archives of Experimental Medicine* 18:145-171.

Khanzode, S.D., Dakhale, G.N., Khanzode, S.S., Saoji, A., Palasodkar, R. 2003. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Report*. 8: 365–370.

Kishi, R., Harabuchi, I., Katakura, Y., Ikeda, T., Miyake, H., 1993. Neurobehavioral effects of chronic occupational exposure to organic solvents among Japanese industrial painters. *Environmental Research*. 62: 303–313.

Kleckner, R.C., McCleave, J.D. 1980. Swimbladder volume maintenance related to initial migratory depth in silver-phase *Anguilla rostrata*. *Science*. 208: 1481-1482.

Koopman-Esseboom, C., Weisglas-Kuperus, N., de Ridde, M. A. J; Van der Pauw, C.G., Tuinstra, L. G. M., Sauer, P. J.J. 1996. Effects of Polychlorinated Biphenyl/Dioxin Exposure and Feeding Type on Infants' Mental and Psychomotor Development. *Pediatrics*. 97: 700-706.

Krishnan, D., Cromwell, H.C., Meserve1, L. 2014. Effects of polychlorinated biphenyl (PCB) exposure on response perseveration and ultrasonic vocalization emission in rat during development. *Endocrine Disruptors*. 2: e969608, DOI: 10.4161/23273739.2014.969608.

Kuriyama, S.N., Chahoud, I., 1994. In utero exposure to low-dose 2,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology*. 202: 185–197.

Kuriyama, S.N., Talsness, C.E., Chahoud, I. 2004. Sex-dependent behavioral changes in rat offspring after in utero administration of a single low dose of PBDE 47. *Organohalogen Compounds*. 66: 3893-3900.

L

Labouze, E., De Toni, A., Ruault, C. 2011. Les impacts d'une exposition aux PCB sur les systèmes hormonaux et urogénital masculins. Anses • *Bulletin de veille scientifique no 12. Santé / Environnement / Travail*. Février 2011

Laperche, V., Bodénan, F., Dictor, M.C., Baranger, P. 2003. Guide méthodologique de l'arsenic, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR, BRGM/RP-52066-FR: 90p.

La Merrill, M. et Birnbaum, L.S. 2011. Childhood obesity and environmental chemicals. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 78 (1): 22 – 48.

Lanphear, B.P., Hornung, R., Khoury, J., Yolton, K., Baghurst, P., Bellinger, D. C., Dietrich, K.N., Tom Greene, R., Rothenberg, S.J., Needleman, H. L., Schnaas, L., Wasserman, G., Graziano, J., Roberts, R. 2005. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis," *Environmental Health Perspectives*. 113 (7): 894–899.

Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., Michaelsen, K.F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research*. 40(2), 1-94.

Lebel, J., Mergler, D., Branches, F., Lucotte, M., Amorim, M., Larribe, F., Dolbec, J. 1998. Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazonian Basin. *Environmental research*. 79: 20-31.

Lee, D.H., Porta, M., Jacobs, D.R. Jr., Vandenberg, L.N. 2014. Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocrine reviews*. 35(4): 557– 601

Lesmana, R., Shimokawa, N., Takatsuru, Y., Iwasaki, T., Koibuchi, N., 2012. Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environmental Toxicology*. doi 10.1002/tox.21815

Le Quesne P.M., McLeod J.G. 1977. Peripheral neuropathy following a single exposure to arsenic. *Journal of the Neurological Sciences*. 32, 437-451.

Li, F.H., Chen, X., Huang, R.J., Xie, Y.P. 2009. Intelligence impact of children with endemic fluorosis caused by fluoride from coal burning [in Chinese]. *Journal of Environmental Health* 26(4):338–340.

Lin, P.Y., Huang, S.Y., Su, K.P. A. 2010. meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in patients with depression. *Biological Psychiatry*. 68(2):140–147

Lee, Y.L., Pai, M.C., Chen, J.H., Guo, Y.L., 2003. Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occupational Medicine*. 53: 479–482.

Lewis D.R., Southwick J.W., Ouellet-Hellstrom R., Rench J. and Calderon R.L. 1999. Drinking water arsenic in Utah: A cohort mortality study. *Environmental Health Perspectives*. 107(5):359-365.

Lee, D.W., Notter, S.A., Thiruchelvam, M., Dever, D. P., Fitzpatrick, R., Kostyniak, P., J., Cory-Slechta, D.A., Opanashuk, L. A. 2012. Subchronic Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254) Exposure Produces Oxidative Damage and Neuronal Death of Ventral Midbrain Dopaminergic Systems. *Toxicological Sciences*. 125(2): 496–508.

Liu, W., Xu, Z., Yang, T., Deng, Y., Xu, B., Feng, S., Li, Y. 2014. The protective role of tea polyphenols against methylmercury-induced neurotoxic effects in rat cerebral cortex via inhibition of oxidative stress. *Free Radical Research*. 1–15.

Liem AK, Furst P, Rappe C. 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Additives and Contaminants*. 17: 241–59.

Luna, B., Garver, K.E., Urban, T.A., Lazar, N.A., Sweeney, J.A. 2004. Maturation of cognitive processes from late childhood to adulthood. *Child Development*. 75: 1357– 1372.

M

Maes, J., Belpaire, C., Goemans, G. 2007. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution*: 1-15.

Maes, J., Belpaire, C., Goemans, G., 2008. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution*. 153: 223-237.

Maia, C.S., Lucena, G.M., Corrêa, P.B., Serra, R.B., Matos, R.W., Menezes, F.C., Santos, S.N., Sousa, J.B., Costa, E.T., Ferreira, V.M. 2009. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology*. 30:23–30.

Malarvannan, G., Belpaire, C., Geeraerts, C., Eulaers, I., Neels, H., Covaci, A.2014. Assessment of persistent brominated and chlorinated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium: Levels, profiles and health risk. *Science of the total environment*.482-483: 222–233.

Malin, A. J., Till, C. 2015. Exposure to fluoridated water and attention deficit hyperactivity disorder prevalence among children and adolescents in the United States: an ecological association. *Environmental Health*. 14(17): 1-10.

Mandal, B. K., Suzuki K. T. 2002. Arsenic round the world: A review. *Talanta*. 58(1): 201-235.

Marklund S, Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47: 469-474.

Marasco, V., Spencer, K.A., Robinson, J., Herzyk, P., Costantin, D. 2013. Developmental post-natal stress can alter the effects of pre-natal stress on the adult redox balance. *General and Comparative Endocrinology*. 191 (2013) 239–246

Marek, R.F., Thorne, P.S., Wang, K., Dewall, J., Hornbuckle, K.C. 2013. PCBs and OH-PCBs in serum from children and mothers in urban and rural U.S. communities. *Environmental Science and Technology*. 47(7): 3353–3361.

Martin, R., Alwyn, F. 2013. Persistent organic pollutants and toxic metals in foods. Oxford Cambridge Philadelphia New Delhi. Woodhead Publishing Limited, 2013.

MaughII, T.H., 1973. DDT: An unrecognized source of Polychlorinated Biphenyls. *Science*. 180 (4086): 568-579.

McCord, J.M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*. 244: 6049-6055.

McCleave, J.D., Kleckner, R.C. 1987. Distribution of leptocephali of the catadromous *Anguilla* species in the western Sargasso Sea in relation to water circulation and migration. *Bulletin of Marine Sciences*. 41: 789-806.

Maximino C, Araujo J, Leao LK, Grisolia AB, Oliveira KR, Lima, MG, Batista Ede J, Crespo-Lopez ME, Gouveia A J, Herculan AM. 2011. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*. 33: 727-734.

Meijer, L., Weiss, J., Van Velzen, M., Beouwer, A., Bergman, Å., Sauer, P.J.J. 2008. Serum concentrations of neutral and phenolic organohalogens in pregnant women and some of their infants in the Netherlands. *Environmental Science and Technology*. 42(9); 3428–3433.

Mercier Y, Gatellier P, Renerre M. 2004. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. *Meat Science*. 66:467–473.

Michel, T.M., Frangou, S., Thiemeyer, D., Camara, S., Jecel, J., Nara, K., Brunklaus, A., Zoehling, R., Riederer P. 2007. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder—a postmortem study. *Psychiatry Research*. 151(1-2):145-50

Moreira, E. G., de Magalhaes Rosa, G.J., Moraes Barros, S.B., Vassilieff, V.S., Vassillieff, I. 2001. Antioxidant defense in rat brain regions after developmental lead exposure. *Toxicology*. 169: 145–151.

Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 1984:11(1):47-60.

Murugesan, P., Kanagaraj, P., Yuvaraj, S., Balasubramanian, K., Aruldas, M. M. Arunakaran, J. 2005. The inhibitory effects of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on Leydig cell LH receptors, steroidogenic enzymes and antioxidant enzymes in adult rats. *Reproductive Toxicology*. 20 (1): 117–126.

Muto, M.A., Lobelle, F. J., Bidanset, J.H., Wurpel, J.N. 1992. Embryotoxicity and neurotoxicity in rats associated with prenatal exposure to DURSBN. *Veterinary and Human Toxicology*. 34:498-501.

Muthuvel, R, Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Gunadharini, D.N., Kanagaraj, P., Jone Stanley, A., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M., Arunakaran, J. 2006. Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats. *Clinica Chimica Acta*. 365 (1–2):297–303.

Muzi G., Dell'omo M., Madeo G., Abbritti G. and Caroli S. 2001. Arsenic poisoning caused by Indian ethnic remedies. *Journal of Pediatrics*. 139: 1-169.

N

Nabi, S. 2014. Effects on depression-like behavior. *Springer India*. 163-168. DOI: 10.1007/978-81-322-1922-4_22.

Naveau, E., Pinson, A., Gerard, A., Nguyen, L., Charlier, C., Thome, J.P., Zoeller, R.T., Bourguignon, J.P.,

Parent, A.S. 2014. Alteration of Rat Fetal Cerebral Cortex Development after Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls. *PLoS ONE* 9(3): e91903. doi:10.1371/journal.pone.0091903.

Neuzil, J., Gebicki, J.M., Stocker, R. 1993 Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochemical Journal*. 293 (3): 601-606.

Ng, T.H.H., Mossey, J.M., Lee, B.K. 2013. Total blood mercury levels and depression among adults in the United States: national health and nutrition examination survey 2005–2008. *PLoS ONE*. 8(11): e79339. doi:10.1371/journal.pone.0079339.

Nguyen, L., Rigo, J.M., Rocher, V., Belachew, S., Malgrange, B., Rogister, B., Leprince, P., Moonen, G. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell and Tissue Research*. 305 (2): 187–202.

O

OECD-Organization for Economic Co-operation and Development, 2007. OECD guideline for the testing of chemicals. Developmental Neurotoxicity Study.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay of lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95:351-358.

Olson, B., Markwell, J. 2007. Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*. 3-4 (48): 1-29.

Onishchenko, N., Tamm, C., Vahter, M., Hokfelt, T., Johnson, J.A., Johnson, D.A., Ceccatelli, S. 2007. Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicological Sciences*. 97:428–37.

Orback P, Nise G. 1989. Neurasthenic complaints and psychometric function of tolueneexposed rotogravure printers. *American Journal of Industrial Medicine*. 77:67–77.

Orenstein, S. T., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Schwartz, J.D., Amarasiriwardena, C. J., Altshul, L. M., Korrick, S. A. 2014. Prenatal organochlorine and methylmercury exposure and memory and learning in school-age children in communities near the New Bedford Harbor Superfund Site, Massachusetts. *Environmental Health Perspectives*. 122:1253–1259.

Orloff, K.G., Dearwent, S., Metcalf, S., Kathman, S., Turner, W. 2003. Human Exposure to Polychlorinated Biphenyls in a Residential Community. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44 (1): 125-131.

Orton, T. G., Saby, N. P. A., Arrouays D., Jolivet C. C., Villanneau E. J., Paroissien E.J., Marchant B. P., Caria G., Barriuso E., Bispo A., Briand O. 2011. Analyzing the Spatial Distribution of PCB Concentrations in Soils Using Below-Quantification Limit Data. *Journal of Environmental Quality*. 41(6): 1893-1905.

P

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 266:730–2.

Power, M. C., Korrick, S., Tchegena, E. J. T., Nee, L. H., Grodstein, F., Huf, H., Weuve, J., Schwartz, J., Weisskopf, M. G. 2014. Lead exposure and rate of change in cognitive function in older women. *Environmental research*. 129: 69–75;

Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* .32, 225–231.

Poisson, E., Fisson, C., Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Couteau, J., Dur, G., Durand, F., Forget-Leray, J., Letendre, J., Souissi, S., Xuereb, B. 2011. Effets de la contamination chimique des organismes en danger? Ed:AAZ Consultants. ISBN: 2-84834-059-2. 70 p.

Q

Quinete, N., Schettgen, T., Bertram, J., Kraus, T. 2014. Occurrence and distribution of PCB metabolites in blood and their potential health effects in humans. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI 10.1007/s11356-014-3136-9.

R

Rashid, C.S., Carter, L.G., Hennig, B., Pearson, K.J. 2013. Perinatal Polychlorinated biphenyl 126 exposure alters offspring body composition. *Journal of pediatric biochemistry*. 3(1): 47–53.

Rauh, V.A., Garfinkel, R., Perera, F.P., Andrews, H.F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whitehead, R., Tang, D., Whyatt, R.W. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*. 118:e1845–e1859.

Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D.B., Whyatt, R. 2011. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental Health Perspectives* 119:1196–1201.

Ryan, J. J.; Rawan, F.K.D 2014. Polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) and their trends in Canadian human milk from 1992 to 2005. *Chemosphere*. 102: 76-86.

- Reaves, D.K., Ginsburg, E., Bang, J., Fleming, J.M. 2015.** Persistent organic pollutants and obesity: potential mechanisms for breast cancer promotion? *Endocrine-related cancer*. 22 (2): R69–R86
- Ren, D.L., Li, K., Lin, D. 1989.** An investigation of intelligence development of children aged 8–14 years in high-fluoride and low-iodine areas. *Chinese Journal of control of Endemic Diseases* 4:251.
- Renwick, A. G., Flynn, A., Fletcher, R. J., Muller, D. J., Tuijtelaars, S., Verhagen, H. 2004.** Risk-benefit analysis of micronutrients. *Food chemistry and toxicology*. 42: 1903-22.
- Ricceri, L., Venerosi, A., Capone, F., Cometa, M.F., Lorenzini, P., Fortuna, S., Calamandrei, G. 2006.** Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: Fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicological Sciences*. 93:105–113.
- Rice, D.C., Reeve, E.A., Herlihy, A., Zoeller, R.T., Thompson, W.D., Markowski, V.P. 2007.** Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicology and Teratology*. 29, 511-520.
- Ripa, L.W. 1992.** Rinses for the control of dental caries. *International dental journal*. 42 (1): 263-269.
- Rodier, P.M.1991.** Developing brain as a target of toxicity. *Environmental Health Perspectives*. 103(6): 73-6.
- Roegge, C.S., Schantz, S.L. 2006.** Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. *Neurotoxicology and Teratology journal*. 28(2): 260–77.

S

- Safe, S. 1990.** Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic consideration which support the development of toxic equivalence factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology*, 21: 51–88.
- Salihoglu, G., Tasdemir, Y. 2009.** Prediction of the PCB pollution in the soils of Bursa, an industrial city in Turkey. *Journal of Hazardous materials*. 164(2-3): 1523–1531.
- Salem, N. Jr., Litman, B., Yong Kim, H. Y. Gawrisch, K. 2001.** Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*. 36 (9): 945-959.
- SACN, Scientific advisory committee on nutrition. 2004.** Advice on fish consumption: benefits and risks. London 1-204.

- Sagiv, S.K., Thurston, S.W., Bellinger, D.C., Altshul, L.M., Korrick, S.A., 2012.** Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-Year-old children exposed prenatally to organochlorines. *Environmental Health Perspectives*. 120(6): 904–909.
- Sánchez-Rodas, D., Luis Gómez-Ariza, J., Oliveira V. 2006.** Development of a rapid extraction procedure for speciation of arsenic in chicken meat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385(7): 1172-1177.
- Scapagnini, G., Davinelli, S., Drago, F., De Lorenzo, A., Oriani, G. 2012.** Antioxidants as antidepressants: factor fiction? *CNS drugs*. 26 (6): 477-490.
- Schantz, S. L., Gasior, D.M., Polverejan, E., McCaffrey, R.J., Sweeney, A.M., Humphrey, H.E., Gardiner, J.C. 2001.** Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environmental Health Perspectives*. 109 (6):605-11.
- Schantz, S.L., Widholm, J.J., Rice, D.C. 2003.** Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environmental Health Perspectives*. 111: 357–576.
- Schantz, S. L., Gasior, D.M., Polverejan, E., McCaffrey, R.J., Sweeney, A.M., Humphrey, H.E., Gardiner, J.C. 2001.** Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environmental Health Perspectives*. 109 (6):605-11.
- Schettgen, T., Alt, A., Esser, A., Kraus; T. 2015.** Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p,p -DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.006.
- Schmid, S., Gujer, E., Zennegg, M., Bucheli, T. D., Desaulles, A. 2005.** Correlation of PCDD/F and PCB concentrations in soil samples from the Swiss soil monitoring network (NABO) to specific parameters of the observation sites. *Chemosphere*. 58 (3):227–234.
- Selvakumar, K., Bavithra, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman,P., Arunakaran, J. 2012.** Polychlorinated Biphenyls-Induced Oxidative Stress on Rat Hippocampus: A Neuroprotective Role of Quercetin. *The Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/980314.
- Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J.2013.** Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in neurobiology* 2013; 0: 1-16.

Sioen, I., Den Hond, E., Nelen, V., Van de Mieroop, E., Croes, K., Van Larebeke, N., Nawrot, T.S., Schoeters, G. 2013. Prenatal exposure to environmental contaminants and behavioural problems at age 7–8 years. *Environment International*. 59: 225–231

Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*. 91, 31S-38S.

Siro, V., Dumas, C., Leblanc, J.C., Margaritis, I. 2011. Food and nutrient intakes of French frequent seafood consumers with regard to fish consumption recommendations: results from the CALIPSO study. *British Journal of Nutrition*. 2011. 105: 1369-1380.

Siro, V., Tard, A., Venisseau, A., Brosseau, A., Marchand, P., Le bizec, B., Leblanc, J-C. 2012. Dietary exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls of French population: Results of the second French total diet study. *Chemosphere*. 88: 492-500.

Smith, A.G. 1991. Chlorinated hydrocarbon insecticides. In: Handbook of Pesticides Toxicology (Hayes WJ, Laws ER, editions). *San Diego/New York: Academic Press*.731–915.

Smith, K.J., Sanderson, K., McNaughton, S.A., Gall, S. L., Dwyer, T., Venn, A. J. 2014. Longitudinal associations between fish consumption and depression in young adults. *American Journal of Epidemiology*. DOI: 10.1093/aje/kwu050.

Soechitram, S.D., Athanasiadou, M., Hovander, L., Bergman, A., Sauer, P.J. 2004. Fetal exposure to PCBs and their hydroxylated metabolites in a Dutch cohort. *Environmental Health Perspectives*. 112: 1208–1212

Sugawara, N., Nakai, K., Nakamura, T., Ohba, T., Suzuki, K., Kameo, S., Satoh, C., Satoh, H., 2006. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. *Archives of Toxicology*. 80, 286–292.

Sun, F., Chen, H. S. 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere*. 71: 1866–1869

Stewart, P.W., Reihmana, J., Lonkya, E.I., Darvilla, T.J., Pagano, J. 2003. Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg. *Neurotoxicology and Teratology*. 25: 11-22.

Stewart, P.W., Lonky, E., Reihman, J., Pagano, J., Gump B.B., Dravill, T. 2008. The relationship between prenatal PCB exposure and intelligence (IQ) in 9-year-old children. *Environmental Health Perspectives*. 116: 1416–1422.

Stringari, J., Nunes, A. K.C., Franco, J. L., Bohrer, D., Garcia, S. C., Dafre, A. L., Milatovic, D., Souza, D. O., Rocha, J.B.T., Aschner, M., Farina, M. 2008. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 15: 227 (1): 147–154.

Strøm, M., Hansen, S., Olsen, S. F., Haug, L. S., Rantakokko, P., Kiviranta, H., Halldorsson, T. I. 2014. Persistent organic pollutants measured in maternal serum and offspring neurodevelopmental outcomes -A prospective study with long-term follow-up. *Environment International*. 68: 41-48.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 85:367-70.

Szlinder-Richert, J., Usydus, Z., Pelczarski, W. 2010. Organochlorine pollutants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. *Chemosphere*. 80: 93–99

Szlinder-Richert, J., Ruczynska, W., Nermer, T., Usydus, Z., Robak, S. 2014. The occurrence of organic contaminants in European eel (*Anguilla anguilla*) in Poland: An environmental quality assessment. *Chemosphere*. 114: 282–290.

Szuster-Ciesielska, A., Slotwińska, M., Stachura, A., Marmurowska-Michalowska, H., Dubas-Slemp, H., Bojarska-Junak, A., Kandefor-Szerszeń, M. 2008. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 32(3):686-94

T

Ta, T. A., Koenig, C. M., Golub, M. S., Pessah, I. N., Qi, L., Aronov, P. A., Berman, R. F. 2011. Bioaccumulation and behavioral effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in perinatally exposed mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 33 (3): 393-404.

Takaomi, A., 2013. Bioaccumulation of organochlorines in relation to the life history in the white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis*. *Marine Pollution Bulletin*. 67: 166–176.

Taly, A., Corringier, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J.-P., 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*. 8: 733–750.

Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, F., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H. 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere*. 83 (2): 175–185.

- Tanskanen A, Hibbeln JR, Tuomilehto J, Uutela, A., Haukkala, A., Viinamaki, H., Lehtonen, J., Vartiainen, E. 2001.** Fish consumption and depressive symptoms in the general population in Finland. *Psychiatric Services*. 52(4):529–531
- Taysse, L., Chambras, C., Marionuet, D., Bosgiraud, C., Deschaux, P.1998.** Basallevel and Induction of cytochrome P 450, EROD, UDPGT, and GST activities in carp (*Cyprinus carpio*) immune organs (spleen and head kidney). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 60, 300-305.
- Tesch, F.-W. 1982.** The Sargasso Sea eel expedition 1979. *Helgoländer Meeresunsters*, 35, 263-277.
- Tesch, F.-W. 2003.** The eel. Blackwell Publishing, fifth edition, 408 p.
- Thomassin, J.F., Touzé, S. avec la collaboration de Branger. 2003.** Mercure et ses composés. Comportement dans les sols, les eaux et les boues de sédiments. BRGM/ RP-51890-FR. 119 p.
- Tian, Y.H., Kim, S.H., Lee, S.Y., Jang, C.G., 2011.** Lactational and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiolytic behavior and cognitive deficit in mice offspring. *Synapse*. 65, 1032–1041.
- Tilson, H.A., Jacobson, J.L., Rogan, W.J. 1990.** Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicology and teratooghy*.12: 239-48.
- Timonen, M., Horrobin, D., Jokelainen, J. 2004.** Fish consumption and depression: the Northern Finland 1966 birth cohort study. *Journal of Affective Disorder*. 82:447-452.
- Tsakiris, S., Angelogianni, P., Schulpis, K.H., Stavridis, C., 2000.** Protective effect of L phenylalanine on rat brain acetylcholineesterase inhibition induced by free radicals. *Clinical Biochemistry*. 33, 103–106
- Tsukamoto, K., Kurok, M. 2014.** Editors. Eels and Humans. Japan. *Springer*.

U

- UNEP. United Nations Environment. 2007.** Examen des projets d'évaluation de la gestion des risques concernant: le pentabromodiphényléther. Genève, 19–23 novembre 2007. http://www.pops.int/documents/meetings/poprc_3/meetingdocs/poprc3_doc/09/K0762835.F_POPS_POPRC_3_9.pdf
- Urbain, A., 2007.** Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de *Gentianella campestris* (L.) Börner et *Gentianella amarella* (L.) Börner ssp. *acuta* (Michx.) J.M.Gillett

(Gentianaceae), et *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat à la Faculté des sciences de l'Université de Genève, p 29.

US ATSDR (United States Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2007. Toxicological Profile for lead. U.S. Department of Health and Human Services. 1-582.

US NTP. 1990. Toxicology and carcinogenesis studies of toluene (CAS no. 108-88-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). Research Triangle Park, NC, US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP Technical Report Series No. 371; NIH Publication No. 90-2826).

V

Van Ael, E., Belpaire, C., Breine, J., Geeraerts, C., Van Thuyne, G., Eulaers, I., Blust, R., Bervoets, L. 2014. Are persistent organic pollutants and metals in eel muscle predictive for the ecological water quality? *Environmental Pollution*. 186: 165-171.

Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Vengatesh, G., Srinivasan, N., Aruldhas, M.M., Arunakaran, J. 2008. Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 26: 585–591.

Viala, A., Botta, A., 2005. Toxicologie. 2^{ème} Edition. TEC and DOC press. 1093p.

Viggiano, D., 2008. The hyperactive syndrome: Metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behavioural Brain Research*. 194: 1–14.

Von Euler, M., Pham, T.M., Hillefors, M., Bjelke, B., Henriksson, B., von Euler, G., 2000. Inhalation of low concentrations of toluene induces persistent effects on a learning retention task, beam-walk performance, and cerebrocortical size in the rat. *Experimental Neurology*. 163, 1–8.

Vorhees CV, Williams MT. 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*. 1(2):848-58.

W

Waid, J.S. 1986. PCBs and the environment, 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 215 pp.

- Wang, J.D., Chen, J.D., 1993.** Acute and chronic neurological symptoms among paint workers exposed to mixtures of organic solvents. *Environ. Res.* 61, 107–116.
- Whitnall, M.H., 1993. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology.* 40, 573–629.
- Wainwright, P.E., 2002.** Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proceeding of Nutrition Society.* 61, 61–69.
- Wang, B.L., Pang, S. T., Sun, J.P., Zhang b, X. L., Li, X. L., Sun d, Y. G., Lu b, X.M., Zhang, Q. 2015.** Levels of polychlorinated biphenyls in settled house dust from urban dwellings in China and their neurodevelopmental effects on preschool-aged children. *Science of the Total Environment* 505: 402–408.
- Waterborg J, Matthews H. 1984.** The lowry method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology.* 1:1-3.
- Weiser, M.J., Wynalda, K, Salem, N.J., Butt, C.M. 2015.** Dietary DHA during development affects depression-like behaviors and biomarkers that emerge after puberty in adolescent rats. *The journal of lipid Research.* 56 (1): 151-166.
- Werboff, Jack; Gottlieb, Jacques S. 1963.** Drugs in pregnancy: Behavioral teratology. *Obstetrical & Gynecological Survey.* 18 (3): 420-423.
- Weisglas-Kuperus, N., Vreugdenhil, H.J.I., Mulder, P.G.H. 2004.** Immunological effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch school children. *Toxicology letters.* 149: 281–285.
- Wess, J., Eglen, R.M., Gautam, D., 2007.** Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery.* 6, 721–733.
- WHO/OMS. 1997.** Report of the Joint FAO/WHO Consultation on food consumption and exposure assessment of chemicals. Report of a FAO/WHO Consultation. Geneva, Switzerland: WHO.
- WHO/OMS. Organisation mondiale de la santé. 2000.** WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000. Chapter 5.10 PCBs Air Quality Guidelines – Second Edition.
- WHO/OMS. World Health Organization. 2006 (a).** Fluoride in Drinking-water by J. Fawell, K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, L. Fewtrell and Y. Magara. ISBN: 1900222965. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Winnekea, G., Bucholskia, A.,Heinzowb , B., Kramer a, U., Schmidt, E., Walkowiaka, J., Wiener d, J. A., Steingruber, H.J. 1998.** Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls PCBs: cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicology Letters.* 102-103:423 -428

Wohlfahrt-Veje, W., Audouze, K., Brunak, S., Antignac, J.P., Le Bizec, B., Juul, A., Skakkebak, N., Main, K.M. 2014. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, furans, and biphenyls (PCDDs/PCDFs and PCBs) in breast milk and early childhood growth and IGF1. *Reproduction*. 147: 391-399.

Wood, G. K., Lipska, B.K., Weinberger, D.R. 1997. Behavioral changes in rats with early ventral hippocampal damage vary with age at damage. *Developmental Brain Research*. 10: 17–25

Y

Yager, S., Forlenza, M.J., Miller, G.E. 2010. Depression and oxidative damage to lipids. *Psychoneuroendocrinology* 35: 1356–1362. doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.03.010.

Youssef, I., Florent-Béchar, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Bihain, B., Olivier, J.L., Leininger-Muller, B., Kriem, B., Oster, T., Pillot, T. 2008. N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiology of aging*. 29 (9): 1319-1333.

Yu, I.T., Lee, N.L., Zhang, X.H., Chen, W.Q., Lam, Y.T., Wong, T.W., 2004. Occupational exposure to mixtures of organic solvents increases the risk of neurological symptoms among printing workers in Hong Kong. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 46, 323-330.

Z

Zhao, W., Cheng, J., Gu, J., Liu, Y., Fujimura, M., Wang, W. 2014. Assessment of neurotoxic effects and brain region distribution in rat offspring prenatally co-exposed to low doses of BDE-99 and methylmercury. *Chemosphère*. 112: 170–176.

Zulfiah, M. M., Willie M. U. D., Musa V. M. 2013. The effects of prenatal methylmercury exposure on trace element and antioxidant levels in rats following 6-hydroxydopamine-induced neuronal insult. *Metabolic brain disease*. DOI 10.1007/s11011-013-9465-4

Valorisation des travaux

Publications scientifiques

Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thomé, J.-P., Eppe, G., Soulimani, R., Bouayed, J., 2014. Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutrition Research*. 34(12): 1075-1084.

Dridi, I., Soualeh, N., Bohn, T., Soulimani, R., Bouayed, J., 2016. Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes hyperactivity in their offspring. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. DOI 10.1024/0300-9837/a000288.

Soualeh, N., Dridi, I., Eppe, G., Némès, C., Soulimani, R., Bouayed, J. 2016. Perinatal programming of depressive-like behavior by inflammation in adult offspring mice whose mothers were fed polluted eels: gender selective effects. *Brain behavior, and immunity*. doi: 10.1016/j.bbi.2016.09.029.

Dridi, I., Soualeh, N., Bouayed, J., Soulimani, R. Dietary early life exposure to chemically contaminated eels induced long-lasting depression-like behavior and the mobilization of the oxidant/pro-oxidant state in SWISS mice brain. (En cours)

Communications lors de congrès internationaux

Communications orales

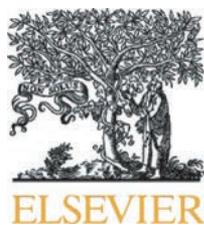
Dridi, I., Bouayed, J., Landoulsi, A., Soulimani, R. Etude préliminaire des effets de la toxicité comportementale d'une exposition précoce à une matrice (poisson) contaminée à un mélange de polluants organiques incluant les polychlorobiphényles (PCB). *1ères Journées de la Fédération Maghrébine de Toxicologie (FMT)*. 17-19 Mars 2013, Monastir, Tunisie.

Communications affichées

Dridi, I., Soulimani, R., Bouayed, J. Neurobehavioral depression in offspring of mouse dams fed chemically contaminated eels may be linked to polychlorinated biphenyls. *3rd Luxembourgish*

Nutrition Conference [NULUX]: Nutrition, Chronic Health complications, and Healthy ageing. October 25nd, 2013 in Luxembourg

Dridi, I., Desor, F., Landoulsi, A., Soulimani, R., Bouayed, J. Effects of perinatal exposure to contaminated eels with PCBs on neuropsychological states including anxiety and mood, at progressive life stages in mice: a preliminary study. *14th International Neurotoxicology Association Meeting, 9-13 Juin 2012, Egmond aan Zee, Pays-Bas.*

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.nrjournal.com

Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze

Imen Dridi^{a,b}, Delphine Leroy^c, Cédric Guignard^d, Georges Scholl^c,
Torsten Bohn^d, Ahmed Landoulsi^b, Jean-Pierre Thomé^c, Gauthier Eppe^c,
Rachid Soulimani^a, Jaouad Bouayed^{a,*}

^a Université de Lorraine, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, MRCA/UR AFPA/INRA, BP 4102, 57040 Metz, France

^b Unité de Biochimie des Lipides et Interaction des Macromolécules en Biologie (03/UR/0902), Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de Bizerte, Zarzouna, Bizerte, Tunisia

^c Université de Liège, CART (Center for Analytical and Research Technology), LEAE (Laboratory of Animal Ecology and Ecotoxicology), B-4000 Sart-Tilman, Belgium

^d Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, Environment and Agro-Biotechnologies Department, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2014

Revised 12 June 2014

Accepted 19 June 2014

Keywords:

Eels

Fatty fish

Cognitive performances

Contaminants

PCBs

Methylmercury

ABSTRACT

Many environmental contaminants are introduced via the diet and may act as neurotoxins and endocrine disrupters, especially influencing growing organisms in early life. The purpose of this study was to examine whether dietary exposure of dams to fish naturally contaminated with xenobiotics, especially with polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (e.g. mercury and lead), resulted in cognitive function deficits in adult offspring mice. Daily, four groups of dams ($n = 10/\text{group}$) ingested standard diet plus paste with/without eels, during gestation and lactation, from gestational day (GD) six until post natal day (PND) 21 (weaning). Dams orally ingested a standardized amount of eel ($0.8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) containing the six non-dioxin-like (NDL) PCBs ($\Sigma 6 \text{ NDL-PCBs}$: 28, 52, 101, 138, 153, and 180) at 0, 85, 216, and $400 \text{ ng kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Results showed that early-life exposure to contaminated eels did not (compared to non-exposed controls) impair immediate working memory in the Y-maze in the offspring assessed at PND 38. Furthermore, it did not significantly impact spatial learning and retention memory as measured in the Morris water maze in adult offspring mice (PND 120–123). Our results suggest that perinatal exposure to contaminated eels does not affect spatial cognitive performances, as assessed by the Y-maze and Morris water maze at adult age. Adverse effects of xenobiotics reported earlier might be camouflaged by beneficial eel constituents, such as n-3 fatty acids. However, additional studies are needed to differentiate between potential positive and negative effects following consumption of food items both rich in nutrients and contaminants.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author. Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France.

E-mail address: jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr (J. Bouayed).

1. Introduction

Neurotoxins and endocrine disrupting compounds include many industrial related compounds such as certain pesticides, dioxins, furans, and polycyclic chlorinated biphenyls (PCBs), inflicting changes on the nervous and the hormonal system that may result in abnormal physiological functions, including growth disturbance, immunological aspects, and cognitive functions [1–3]. Especially when consumed during early life-stages, those compounds may show stronger effects, as the immature organism has less defense mechanism available and the stage for physiological and psychological traits is yet to be set [4–6]. For example, we have previously shown that the consumption of eels by the parental generation can result in hyperactive traits associated with a depressed activity in acetylcholinesterase in the hippocampus in female offspring mice (unpublished results).

For the majority of these compounds, diet is the main contributor of exposure [2,7]. One predominant example is the intake via fish and water-living creatures, especially those ranking high in the food chain and being rich in lipids, and fish consumption has been linked to human PCB contamination via the oral route [8–10]. European eel (*Anguilla anguilla* L.) is a migratory fish with an extraordinary life cycle that begins and ends in the Atlantic Ocean; however, the main part of the eel's life stages is spent in the freshwater habitats including rivers, streams and lakes. European eels can live over 90 years but more commonly 10 to 15 years [11], during which they consume a variety of various smaller prey. Eels have a carnivorous regime as they eat a variety of animal species such as insects, worms, caterpillars and spiders, crustaceans such as shrimps as well as frogs, fish eggs, fry and small fish [11]. Eels are fatty fish with fat in their flesh unlike white fish that accumulate fat rather in their livers, and are very low in fat [10]. In general, fatty fish are composed of 5% to 20% fat while white fish contains 1% to 2% fat, with estimated averages of long chain ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of 2 g and 0.3 g/100 g, respectively (total n-3 PUFAs calculated as the sum of eicosapentaenoic acid [20:5n-3], docosapentaenoic acid [22:5n-3] and docosahexaenoic acid [DHA; 22:6n-3]) [10]. Thus, eels may accumulate more readily xenobiotic contaminants, in particular lipophilic ones such as PCBs, but also heavy metals, e.g. mercury (especially in its organometallic form, dimethylmercury) in their muscles [10,12]. These contaminants accumulate in adipose tissue and are not released until spawning; thus accumulating them during almost all their life [11]. During its life cycle, European eel inhabits diverse ranges of aquatic environments and thus this species constitutes a good bio-indicator for assessing general ecosystem health and environmental levels of pollutants [12–14].

In addition, eel is a highly appreciated item and thus might pose a toxicological risk to consumers, especially for pregnant or lactating women and young children. Due to the long-standing human tradition of eel usage as food, this fish represents a popular food item in many populations, e.g. in many European, Asian and North America countries. Thus, several eel dishes have been developed such as kabayaki, smoked eel, eel pie, jellied eels, angulas, eel stew, eel curry and matelote d'anguille [11]. Its high lipid content represents a rich source of essential nutrients including linoleic and

linolenic acid, iodine, and vitamin D [15]. The increasing demand for eels as a food source has resulted in the use of eel aquaculture as an alternative source of maintaining a stable supply of eels to the market. Thus, 90% to 95% of current eel production is attributed to aquaculture of wild-caught juveniles, which is practiced in several countries including the UK, France, the Scandinavian countries, Morocco, Australia, China, Taiwan, and Japan [16,17].

To the best of our knowledge, this is the first animal study that aimed to investigate the effect of early-life exposure to naturally PCB and heavy metal polluted fish on cognitive functions of offspring mice. We hypothesized that exposure to chemically contaminated eels would impact the cognitive function of offspring adult mice. To test our hypothesis, the research objective was to use the Y-maze to assess immediate working memory and the Morris water maze spatial navigation task to assess spatial learning and retention memory in mice. The contamination level of eels was also assessed, focusing on PCB and heavy metal contamination.

2. Methods and materials

2.1. Chemicals and standards

Unless otherwise stated, all chemicals were of analytical grade or superior. High purity ($\geq 98\%$) $^{13}\text{C}_{12}$ labelled analogues of the six non dioxin-like NDL-PCB were supplied by Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA. Only solvents of dioxins analysis purity grade (n-hexane: $>95\%$; dichloromethane: $\geq 99.5\%$; toluene: $\geq 99.5\%$) were used. They were provided by Biosolve, The Netherlands. Nitric acid (trace analysis grade, minimum 67%) was from LGC Standards, France, hydrogen peroxide (20–35 w/w) from Fisher Scientific, Belgium. High purity (Milli-Q) water was employed throughout and was produced in the laboratory by a Millipore system, Brussels, Belgium.

2.2. Animals

Sexually mature male ($n = 40$) and female ($n = 50$) Swiss albino mice (CD 1, Charles River, France), 9 weeks of age (30–40 g), were employed in this trial. Mice (5 per gender) were housed in a cage that was maintained under a reversed light/dark cycle (light: 8 PM–8 AM) at $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, and $55\% \pm 10\%$ relative humidity. A commercial rodent diet that supplied all nutrients for mice was provided (SDS Dietex, St Gratien, France), and diet and tap water were provided ad libitum.

2.3. Preparation of the diets

Standard diet consisted of food pellets enriched or not with naturally contaminated eels. Contaminated diet (paste with eels) was prepared by mixing sea and river eels at various proportions: NDL-PCBs $85 \text{ ng kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (sea eels only), $216 \text{ ng kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (a mix of sea and river eels), and $400 \text{ ng kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (river eels only). Constituents of the diets were mixed with a kitchen household blender (Robot monofonction Seb Valentin 8553, France), i.e. 10 g of powdered food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) with 10 mL water, 0.5 mL sweep syrup, 1 mL

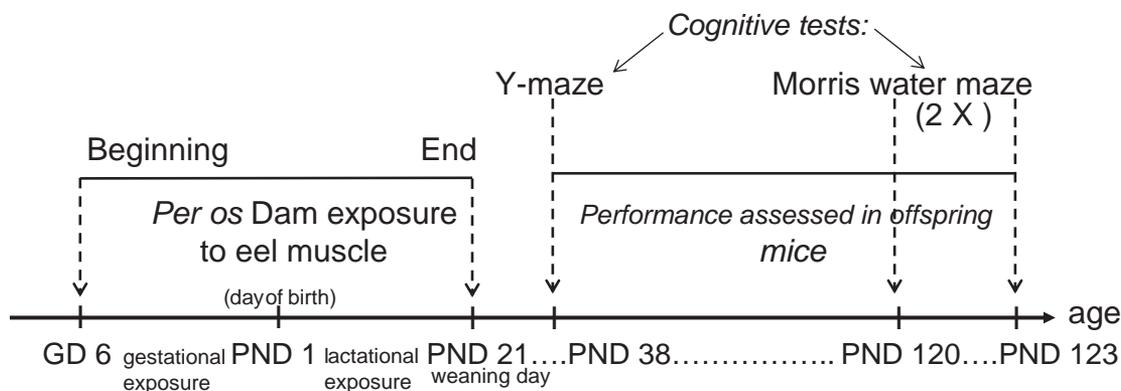


Fig. 1 – Experimental design of the mice exposure study. The study consisted of (i) exposing pregnant and lactating dams to naturally polluted eels rich in PCBs and (ii) assessing the cognitive function of their offspring at PNDs 38, 120, and 123. The Morris water maze was performed 2 times in order to assess both spatial learning and its retention (retention memory). The control offspring corresponded to mice whose mothers were fed the standard diet as no PCB-free eels were found.

corn oil and 64 mg of lyophilized eel to obtain a homogenous paste, in which the dose of the 6 indicator PCBs (28, 52, 101, 138, 153, and 180) was prepared for each experimental group. On the following day, the paste was cut to smaller ones according to the weight of pregnant and nursing females in order to deliver NDL-PCBs 0, 85, 216, or 400 ng kg⁻¹ d⁻¹. For control mice (n = 10), the paste was prepared with the same ingredients cited above but without eel, as no PCB-free eels were found.

The doses of this study were chosen primarily based on the average daily intake in humans of the total NDL-PCBs, estimated by European Food Safety Authority to be in the range of 10 to 45 ng/kg body weight (b.w.) per day [2]. Secondly, the interspecies uncertainty factor of 10 was also taken into account to extrapolate results from animals to humans, as the interspecies variation has been widely considered in risk assessment procedures, assuming that humans may be 10-fold more sensitive than animals [18,19]. Thus, mice exposure to $\Sigma 6$ NDL-PCBs at 85 and 216 ng kg⁻¹ d⁻¹ were assumed to reflect human average daily intake of total NDL-PCBs, corresponding to a human intake of $\Sigma 6$ NDL-PCBs about 5 to 23 ng kg⁻¹ d⁻¹. However, 400 ng kg⁻¹ d⁻¹ should reflect high dietary PCB exposure. For example some specific subpopulations (Baltic fishermen), have been reported to ingest from fish up to 40 ng kg⁻¹ d⁻¹ of the $\Sigma 6$ NDL-PCBs [2].

As for the contaminated eels, 5 river eels (la Meuse, Belgium) were stunned and caught with a dip net in spring 2011, and 10 reared eels were purchased from Zon-Aquafarming (Helmond, The Netherlands). Biologists of the University of Liège (ULg) identified them as *Anguilla anguilla* during autopsy. Then, eels muscle was sampled, separated into 2 pools according to their origin, freeze dried, mixed and kept at -20°C until paste preparation. Additionally, a portion of each pool was used to characterize their contamination level.

2.4. Study design

After an acclimatization period (14 days), mating was done overnight (female mice to males 2:1) and were examined for copulatory plugs the following morning. The mating session was terminated with forty fecundated females (10 dams per

group). These females were then housed individually. Two weeks post-fecundation nesting material was provided (cotton nest square). Parturition day was considered as postnatal day (PND) 1, and the gender and individual pup weight were recorded. When possible, litters were reduced to ten pups (composed equally of both sexes as recommended by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) [20]) as to avoid the effect of litter size on pup development [21,22]. Nurturing females were allocated to >experimental groups by stratified randomization to result in comparable mean body weights in each litter across all groups on PND 1.

An overview of the experimental design of dam exposure is given in Fig. 1. From GD 6 until PND 21 (weaning), 40 dams daily ingested the standard diet plus paste with/without eels at the 3 concentration levels. The appropriate pastes were filed daily into the cage of each female during the exposure period. Paste was completely eaten by each female and no residual was found in the cage. After weaning (PND 21), mice pups were housed with their same-sex littermates in groups of 5/cage (OECD [20]). Male and female mice were confined into two different rooms to exclude the effect of sexual pheromones at adult age on behavior. To avoid introducing variance, all behavioral tests were conducted between 10 AM and 1 PM. All results were recorded and evaluated by an experienced human observer.

All animal experiments were in accordance with the European Union (Directive 2010/63/EU), and were approved by the institutional ethics committee of the University of Lorraine (authorization number CELMEA-2013-0010). Eel fishing was performed in agreement with the Ministry of the Walloon region, Belgium (authorization number DNF/DCP/CD705.1/Sortie 2007: 31416).

2.5. NDL-PCB analyses

Contamination level of each NDL-PCB was determined for the two pools of eels by a fully validated method in an ISO 17025 accredited laboratory (Center of Analytical Research and Technology, CART). The used methodology is based on the

EN16215:2011 European standard and consists in: a fat extraction by pressurized solvent extraction with the ASE system (Thermo-Fisher, Palo-Alto, CA, USA), followed by a multi-column liquid-solid chromatography purification achieved on a PowerPrep automat system (FMS, Watertown, CA, USA). The analysis was performed by gas chromatography coupled with a sector high-resolution mass spectrometer (GC-HRMS Autospec Premier Waters, Millford, MA, USA). The quantitative aspect is raised by the isotope dilution involving a $^{13}\text{C}_{12}$ analog of each NDL-PCB.

2.6. Heavy metal analysis

2.6.1. Sample mineralization

Prior to inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) analysis, samples were submitted to total mineralization using microwave digestion (Multiwave Pro microwave oven, Anton Paar). About 250 mg of sample material was weighted into a PFA reactor, then 7 mL of nitric acid and 3 mL of hydrogen peroxide were added. The microwave power was increased to 1500 W in 10 minutes, then kept during 15 minutes. After cooling, the samples were recovered in 25 mL of water, then diluted 5 times with Millipore water before the ICP-MS analysis.

2.6.2. Inductively coupled plasma–mass spectrometry analysis

The metals (namely Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Pb, and Pt) were analysed in the digested samples by ICP-MS on an Elan DRC-e (Perkin Elmer, MA, USA), equipped with a micronebulizer associated with a cyclonic spray chamber. The samples were quantified using internal calibration, based on standard solutions prepared with a Multi-element ICP Standard Solution (30E) (Chemlab, Zedelgem, Belgium), and a Platinum ICP Standard (LGC Standards, Molsheim, France).

2.6.3. Mercury analysis

Mercury was analysed on an SMS 100 (Perkin Elmer) direct Mercury analyser, based on thermal desorption, gold amalgamation and atomic absorption. For the eel samples, triplicates of about 20 to 30 mg were analysed. For matrices containing lower amounts of Hg (feed excipients), about 400 mg were analysed to increase the sensitivity. The samples were quantified with calibration solutions prepared with Mercury Standard Solution (Plasma HIQU) (Chemlab).

2.7. Behavioral tests

According to the OECD guidelines [20] for the testing of chemicals, the weighing, and behavioral tests, were conducted in one pup of each gender, selected at random from each litter group i.e., 10/gender/group, resulting in a total of $n = 20/\text{group}$.

2.7.1. Y-maze for assessing working memory

Immediate working memory performance was assessed on PND 38, by recording spontaneous alternation behavior in a Y-maze [22]. The maze was of black painted wood, each arm 25 cm long, 14 cm high, 5 cm wide and positioned at equal angles. Mice were placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during 3 min. The number of arm entries was recorded. An arm entry was considered to be

completed when the four paws of the mouse were completely placed in the arm. Alternation was defined as triplets of explored arms and counted only if the mouse entered into the three arms of maze (without revisiting the first arm at the third visit). The percentage of spontaneous alternation was calculated as the ratio of successful overlapping alternations by the total possible triplets (defined as the total number of arm entries minus 2) multiplied by 100 [22].

2.7.2. The Morris water maze for spatial learning and memory

The Morris water maze was performed on PND 120 and PND 123 to evaluate spatial learning and memory [23,24]. For this purpose, an open circular pool (100 cm in diameter) was chosen, filled ca. half of the height with water ($23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$). Four different geometric shapes were glued in the surroundings of the pool, marking each quadrant. The animal objective was to locate a platform that was hidden 1 cm underneath the water surface (placed in a fixed position in the middle of one quadrant of the pool). The platform was camouflaged by placing milk in the water. Mice were given five consecutive trials per day (a single training session [25]), each trial lasting 120 s, with a 30 sec inter-trial interval. In this step, the animal had to learn to navigate a direct path to the hidden platform, resulting in less time for reaching it. On PND 120, the spatial learning task started by gently placing the mouse into the water with its head towards the pool wall in any of the three quadrants without the platform. If an animal found the platform within 120 s, it was left to stay on the platform for 30 s. If not, animals were gently guided to the platform by the experimenter. To assess retention memory, 72 h (i.e. PND 123) post spatial learning task, the mouse had to undergo another trial. The latency (time) to escape to the platform was recorded for each animal.

2.8. Statistical analyses

As for the dependent variables including offspring body weight and the acquisition phase in the Morris water maze i.e., the latency escape, they were analyzed using three-way ANOVA, considering perinatal exposure to chemically contaminated eels and gender as between-subject fixed-factors, and trials as the repeated, within-subject factor. For the retention memory, the latency escape was analyzed using two-way ANOVA with exposure and gender as the main factors. The same procedure was used to analyze the spontaneous alternation in the three arms of the Y-maze. All data were reported as the mean (\pm SEM). Significance was set at $P < .05$ (2-sided). All statistical analyses were performed using the Statview 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Inc). Assumptions of normality and equal variance were assessed by normality plots and box plots, respectively.

3. Results

3.1. Body weight of offspring mice

No significant effect of the dams' exposure to contaminated eels on offspring growth was observed across all groups over

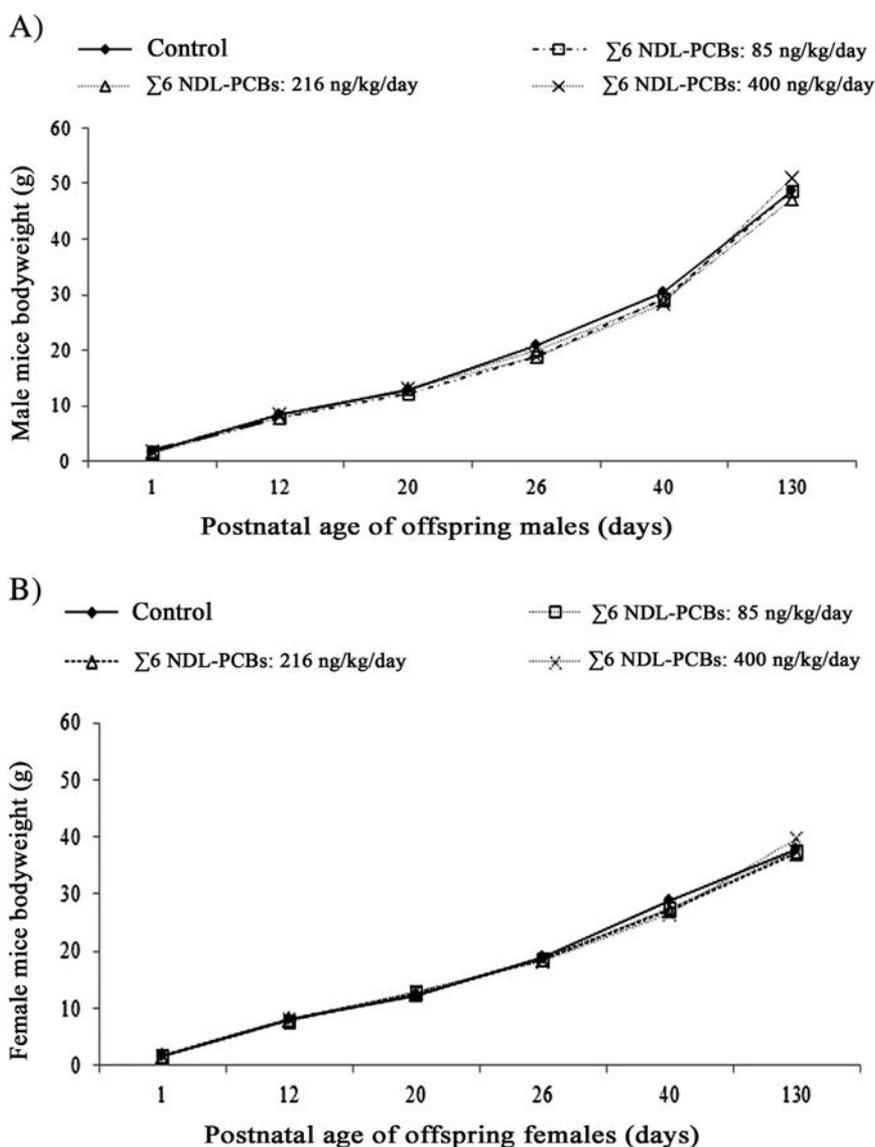


Fig. 2 – Body weight of offspring male (A) and female (B) mice over the 130 days of the study, i.e., from the day of birth or postnatal day 1 (PND 1) until PND 130. Offspring mice were exposed during the perinatal period to polluted eel, in which the concentrations of the PCB indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) were 85, 216, and 400 ng/kg, compared to control offspring mice whose mothers received the standard diet without fish (PCB-free diet, $n = 10/\text{sex}/\text{group}$). The data are reported as mean values.

the 130 days of the study: [exposure: $F(3.633) = 0.05$, $P = .98$; exposure \times gender: $F(3.629) = 0.02$, $P = .99$; exposure \times age: $F(21.605) = 1.30$, $P = .16$; exposure \times age \times gender: $F(21.375) = 0.304$, $P = .99$]. Nevertheless, offspring mice gained weight over time, as shown by a significant effect of age [$F(7.629) = 1782.326$, $P < .001$]. In addition, postnatal evolution of the body weight was gender-dependent [$F(7.635) = 2.52$, $P = .11$] (Fig. 2).

3.2. PCB and metal analysis

As seen in Table 1, the concentration of the $\Sigma 6$ PCB-NDLs is below the maximum permissible level in eel muscle as defined by the EU. River eels caught in la Meuse, Belgium were slightly below the permissible level, and had five times higher PCB levels than reared eels. Mercury, lead and cadmium levels in both river

and reared eels were below the maximum permissible levels in fish. Arsenic was more concentrated in river eels than reared eels. However, the risks associated from consuming a portion of eels (70–140 g) should be low, as it was below the tolerable weekly intake for an adult of 60–70 g (Table 2).

3.3. Y-maze

No significant effects were found for perinatal exposure to contaminated eel exposure: ($F(3.76) = 1.305$, $P = .27$) nor for gender [gender: $F(1.78) = 0.441$, $P = .50$] or their interaction [exposure \times gender: $F(1.78) = 0.441$, $P = .50$] on the percentage of spontaneous alternation. This result suggests that early-life exposure to chemically contaminated eels does not impair immediate spatial working memory (Table 3).

Table 1 – Non-dioxin like (NDL)-PCB concentrations in eels (reared vs. river eels), maximum permitted levels and tolerable daily intakes

	PCB indicators	NDL-PCB concentrations (ng/g) fresh weight			Tolerable daily intake (ng/kg b.w. day)	References
		River eels (la Meuse, Belgium)	Reared eels (Netherlands)	Maximum permissible level in eel muscle		
6 PCB-NDL congeners	PCB 28	8.9	6.6	ND	ND	
	PCB 52	35.6	14.3	ND	ND	
	PCB 101	31.8	9.6	ND	ND	
	PCB 138	59.3	8.9	ND	ND	
	PCB 153	78.6	10.6	ND	ND	
	PCB 180	36.4	3.0	ND	ND	
Σ6 PCB-NDLs		250.5	52.9	300	10*	[48,49]
Total PCBs					20	[49]

ND, no data available.
* Based on the estimation that Σ6 PCB-NDLs reflects almost half of the total PCBs [49].

3.4. Morris water maze

Three-way ANOVA revealed a significant main effect for perinatal exposure to contaminated eels during the acquisition phase [exposure: $F(3.396) = 3.065$, $P = .02$]. Neither a gender effect [$F(1.397) = 0.102$, $P = .75$] nor trial effect [$F(4.395) = 1.849$, $P = .12$] were found. No interaction between the 3 main factors was found [exposure x trials: $F(12.380) = 0.52$, $P = .89$; exposure x gender $F(3.91) = 0.54$, $P = .65$; [gender x trials: $F(4.38) = 0.703$, $P = .59$]; exposure x gender x trials $F(12.359) = 1.10$, $P = .35$]. At each trial, one-way analysis of variance revealed no significant differences between groups ($P > .05$), indicating the absence of exposure effect. As for retention memory, no significant effects were found for perinatal exposure to contaminated eels [exposure: $F(3.76) = 0.340$, $P = .79$] or gender [gender: $F(1.78) = 0.109$, $P = .74$] or their interaction (on the

latency time to find the escape platform in the pool) [exposure x gender: $F(3.91) = 0.56$, $P = .63$] (Table 3).

4. Discussion

In this study, selected aspects of learning and memory were examined in offspring mice exposed at early life-stage to a complex of dietary derived contaminants including PCBs and heavy metals accumulated in eels during their life cycle. Exposure to contaminated eels based on their concentration of the Σ6 NDL-PCB (85-400 ng kg⁻¹ d⁻¹) indicators were chosen to mimic human diet PCBs i.e., average dietary intakes to high exposure. Cognitive performance of offspring mice whose mothers were exposed to chemically contaminated eels in the Y-maze were not significantly different to those whose

Table 2 – Metal concentrations in eel muscle (reared vs. river eels), maximum permitted levels and tolerable weekly intakes

Metals	Metal concentrations (µg/g) weight			Tolerable weekly intake (TWI: µg/kg b.w.)	References
	River eels [#] (la Meuse, Belgium)	Reared eels [#] (Netherlands)	Maximum levels in the muscle meat of fish (wet weight basis)		
Aluminium	7.076	6.899	ND	1000	[50]
Vanadium	<0.588	<0.588	ND	ND	[51]
Chromium	0.594	<0.151	ND	637	[52]
Manganese	0.853	0.562	ND	ND	
Iron	10.94	8.351	ND	5600	[53]
Cobalt	0.015	0.028	ND	ND	
Nikel	0.140	0.066	ND	ND	
Copper	0.718	0.725	ND	3500	[53]
Zinc	38.28	49.24	ND	7000	[53]
Arsenic	3.019	<0.475	ND	15	[54]
Selenium	1.802	0.399	ND	ND	
Molybdenum	0.052	0.042	ND	ND	
Cadmium	0.024	<0.010	0.1	2.5*	[48,55]
Lead	0.043	0.033	0.3	25	[48,53]
Platinum	<0.012	<0.012	ND	ND	
Mercury	0.277	0.550	1	1.6	[48,53]

ND, no data available.

* Estimate based on the values expressed as TDI.

[#] Weight given as µg/g dry weight; average water content 51.08%.

Table 3 – Cognitive spatial performance of offspring mice in the Y-maze and the Morris water maze. Contaminated eel was fed to mothers during pregnancy and lactation, from GD 6 until PND 21 (weaning), at the following concentrations (expressed as the $\Sigma 6$ NDL-PCBs): 0; 85; 216, and 400 ng kg⁻¹ d⁻¹

	Cognitive function: related measured performances	Time of testing	$\Sigma 6$ NDL-PCBs (ng kg ⁻¹ d ⁻¹)				
			0	85	216	400	
Y-maze	-Immediate working memory: % spontaneous alternation	Short-term memory testing (PND 38)	62.7 ± 4.0 %	62.7 ± 3.3 %	64.7 ± 3.4 %	71.02 ± 2.4 %	
Morris water maze	-Acquisition process (spatial learning task): escape latency (s)	Single training	Trial 1	53.0 ± 8.5 (s)	52.5 ± 11.6 (s)	38.5 ± 8.4 (s)	34 ± 7.6 (s)
		session (PND120)	Trial 2	45.6 ± 8.9 (s)	56.2 ± 11.6 (s)	36.3 ± 6.8 (s)	47.8 ± 9.6 (s)
			Trial 3	51.8 ± 8.6 (s)	52.2 ± 9.9 (s)	30.5 ± 7.9 (s)	51.2 ± 10.1 (s)
			Trial 4	34.3 ± 8.7 (s)	48.6 ± 11.1 (s)	28.0 ± 32.5 (s)	37.3 ± 8.9 (s)
			Trial 5	38.1 ± 8.2 (s)	36.9 ± 10.0 (s)	25.0 ± 7.4 (s)	37.6 ± 7.0 (s)
-Consolidation process (post spatial learning task): escape latency (s)	Retention memory testing (PND 123)		26.8 ± 5.4 (s)	28.2 ± 8.0 (s)	23.8 ± 4.3 (s)	29.5 ± 33.8 (s)	

Values represent means ± SEM of 20 individuals per group.

mothers were not exposed (controls), suggesting that immediate spatial memory was not affected at young-adult age (PND 38). Furthermore, performances of perinatally exposed offspring mice during the acquisition phase in the Morris water maze were statistically not different from controls, suggesting that spatial learning ability was not altered at adult age (PND 120). In addition, on PND 123, retention of the previously learned task was not impaired by early-life exposure to contaminated eels.

Working memory involves storage and manipulation of temporary information that implicates both the hippocampus and prefrontal cortex [26,27]. The Y-maze is a spatial memory test based on the natural tendency of rodents to exert spontaneous alternation in the three arms of the maze with about 60–70% of success [28]. Our results showed that successful spontaneous alternation behavior of exposed offspring mice was about 63% to 71%, which corresponds to the usual working memory performance of untreated mice in a Y-maze, a score also reached by control offspring (63%). Spatial working memory task was performed at PND 38, an age in rodent development that is considered as analogues to the periadolescence period (ca. 11-13 years) in human. Thus, our study suggests that immediate working memory was preserved in offspring mice despite an early-life exposure to xenobiotics including PCBs and Hg.

Furthermore, in this study, the Morris water maze, a well-known test to assess spatial learning and memory in rodents [23–25], was employed. Acquisition of spatial information in rodents consists of learning to escape from the pool by finding the hidden platform during a session of trials. The time required to reach the submerged platform (escape latency) is a valid variable to assess spatial learning. Our results indicated that early-life exposure to contaminated eels does not impair the acquisition process in the Morris water-maze training session. A memory test for the location of the escape platform, maintained in the same position in the pool, was performed 3 days later. Retention testing during the spatial water-maze task indicated that offspring mice (exposed vs. controls) had a similar spatial long-term memory performance. This finding indicated that early-life exposure to contaminated eels does not affect memory consolidation process in offspring mice. Therefore, our results from the Morris water maze suggest

that consuming contaminated eels by dams during pregnancy and lactation does not result in cognitive deficits in their offspring at adult age.

Although there is contradictory evidence on the relation between maternal fish consumption and cognitive deficits in offspring; several studies have shown negative effects upon dietary consumption of persistent organic pollutants at several stages of life. For example, in adult humans, ingestion of Great Lake fish rich in PCBs was associated with lower scores of memory and learning ability [29] compared to controls (non-fish eaters). In animals, e.g. Rhesus monkey, it has been demonstrated that in utero exposure to PCBs (Aroclor 1016 or Aroclor 1248) caused cognitive deficits in the offspring (assessed at age 4-6) [30]. PCB exposure showed to reduce circulating T4 levels in 60 d old rats, and resulted in modest memory defects [31]. However, the fact that no effects were detected in the present study raises the possibility that healthy components of eels, such as n-3 fatty acids, have counterbalanced the adverse effects of xenobiotics. Indeed, it has been recognized that these essential fatty acids could overlay negative effects of pollutants such as dimethylmercury neurotoxicity, underestimating toxicity [32]. It is important to emphasize that eels during their life cycle may accumulate an array of toxic compounds including PCBs, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs), organochlorine pesticides, perfluorinated compounds, brominated flame retardants, heavy metals and many more [11–14,33–35]. For instance, in freshwater and marine fish, NDL-PCBs levels and DL-PCBs + total dioxins (PCDD/Fs) were found to be positively correlated. This further raises the possibility that with a complex mixture of xenobiotics, besides synergistic and additive effects, antagonistic effects may also occur.

To date, balancing the risk of fish consumption constitutes a complex task for public health agencies, particularly due to differences in human sensitivity to toxins. It is assumed that women of childbearing age, pregnant or nursing women, and young children constitute sensitive populations for neurodevelopmental risks from exposure to contaminants in fish. In their report, the Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) published advices for fish consumption, with particular reference to fatty fish, based on nutritional and

toxicological considerations. For the general and sensitive individuals it has been recommended to eat fish at least twice a week, of which one should be fatty, with a restriction concerning pregnant and lactating women on certain fish e.g., marlin and swordfish due to methylmercury contamination [10]. A methylmercury intake of 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./week was used as a guideline to protect against neurodevelopmental effects in the fetus [10].

In our study, it was surprisingly found that reared eels contained more Hg (550 ng/g dry weight [d.w.]), lead (0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.) and chromium (0.59 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.) than river eels (276 ng/g d.w., 0.03 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w. and <0.15 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w., respectively). In contrast, in river eels, arsenic (3 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.) and cadmium (0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.) were detected at higher concentration (vs. reared eels: <0.47 and <0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w., respectively). Permissible levels in the EU for fish for babies and infants are 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ mercury, 0.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ (lead) and 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ for Cd [36], thus levels of heavy metals in eel cannot be considered high or even extreme. Nevertheless, infant food formula has much more stringent recommendations with 10 fold lower maximum residue concentrations. Differences in the concentration of these inorganic contaminants, which have both natural but mainly anthropic origins, depend on the quality of aquatic mediums, in which the eels have lived. However, selenium, a generally considered beneficial nutrient in fish was found in our metal analysis at higher concentrations in river eels (1.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.) than in reared eels (0.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ d.w.). A more stringent recommendation with respect to fish consumption was proposed by the National Food Agency Finland, advising children and young people at fertile age not to consume large herring and salmon more than once or twice a month, owing to the high concentration of dioxins (PCDD/Fs) detected in these fish caught in the Baltic Sea [12]; and Norway has also recently issued a warning concerning farmed salmon.

From nutritional considerations, consuming fatty fish may do have beneficial effects on fetal development. For the human developing brain during growth, ω -fatty acids including DHA and arachidonic acid (AA, 20:4n-6) play an essential role as they are integral components of neuronal membranes [37,38]. Fatty fish is an important dietary source to deliver DHA and AA (ca. 500 and 125 $\text{mg}/100$ g [15]) for fetuses and newborns that depend on the maternal supply in particular during the last trimester of pregnancy till the end of the first year of life. For instance, during the brain's growth spurt (last trimester of pregnancy), 15–22 mg/week of DHA enter the fetal brain; however, during the first year of life approx. 76 mg/week is needed for brain growth [37]. In adult human brain, lipids represent 50 to 60% of dry weight, mainly (ca. 35%) in form of PUFAs, of which AA and DHA are the principal ones [37].

It has been thought that the optimal efficiency of n-3 fatty acid supplementation on cognitive performances including spatial memory is reached when starting early in life; however, it becomes less effective when starting at later ages [39]. This response difference between the immature and mature brain might be due to the temporal windows of opportunity and vulnerability. Nevertheless, it has been shown that fish ingredients such as PUFAs and selenium were unable to counterbalance the deleterious effects of fish-associated mercury on working memory in animals exposed at young age (3 weeks old) [40]. Although high fish consump-

tion (1.2 portions/wk) by pregnant women was associated with better infant cognition (assessed at 6 months of age) in a prospective US pregnancy and child cohort study; higher mercury levels were associated with lower cognition [41]. As a result, women have been advised to continue eating fish during pregnancy, choosing species with lower mercury contamination such as small fatty fish including sardines, and canned tuna [41]. Furthermore, no adverse effects of perinatal exposure to MeHg from fish consumption on cognitive development were found in cohort studies of Seychellois children (assessed at 66 months [42] and at 9 years of age [43]); mothers reported consuming 12 fish meals per week [43]. In contrast, prospective studies have associated high fish consumption with high mercury exposure in both Spanish preschoolers (4 years old) [44] and children (7 years old) from the Faroe Islands [45] in whom cognitive performance deficits were detected. Besides methylmercury, deficits in cognitive function were also attributed to perinatal exposure to lead and PCBs; which can alone or in mixture act as neurotoxins. For instance lead, even at low doses, impairs cognitive functions in childhood such as attention and intellectual function [46]. In a cohort study, maternal consumption of PCB-contaminated fish was associated with poorer visual recognition memory in babies at 7 months postpartum [47].

In general, chemically contaminated fish and seafood involves exposure to multiple contaminants. In such a scenario, it is hard to attribute adverse effects to one contaminant or even a family of contaminants. It has been postulated that the combined exposure to MeHg and PCBs may have an interactive effect, but in vitro at higher concentrations or longer durations, the two chemicals antagonized each other [3]. In a recent study, it has been shown that prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead resulted in impaired cognitive development in Inuit infants from Arctic Québec, assessed at 6.5 and 11 months. It has been postulated that each type of contaminants may have its own "behavioral signature", with PCBs being associated with visual recognition memory, MeHg with working memory and an early precursor of executive function, and lead with processing speed [46].

In conclusion, we investigated with an accepted mouse model of behavior the effects of consuming a diet rich in contaminated eels on the following generation. This is an important dietary approach relevant also to humans, where adverse effects of dietary constituents or contaminants may especially be observed in the early childhood, following postnatal exposure. Our results could not demonstrate any cognitive deficits at adult age in offspring mice of dams consuming eels contaminated by PCB and heavy metals during pregnancy and lactation. These results do not prove that consuming environmentally contaminated eels does not pose any risk for brain development. The absence of effects might also be due to the fact that contaminant concentrations were not in the range affecting cognitive function, as contaminants could act on different nervous function with different thresholds of sensitivity. In addition, adverse effects on other brain functions which were not assessed in this study may become detectable at later life stages, e.g. induced hyperactivity (not at PND 47 but at PNDs 195, 305 and 329, unpublished results). Extrapolation of these results from mice

to humans should also be carried out prudently as species differences with regard to sensitivity to contaminants, due to differences in absorption, metabolism, and excretion do exist. Further studies on the relationship between maternal fish consumption and cognitive functions in offspring at various stages of life are warranted to predict cognitive functions of future generations.

Acknowledgment

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-CESA-000). River eels used in this study were fished for a scientific study sponsored by the Service Public de Wallonie, DGO “Agriculture, Ressources Naturelles et Environnement, no. 10/65/593”. The authors thank P. Poncin for river eel fishing.

REFERENCES

- [1] Bohn T, Cocco E, Guignard C, Gourdol L, Hoffmann L. Determination of atrazine and degradation products in Luxembourgish drinking water: origin and fate of potential endocrine disrupting pesticides. *Food Addit Contam* 2011;28:1041–54.
- [2] EFSA. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxine-like polychlorinated biphenyles (PCB) in feed and Food. *EFSA J* 2005;1:137.
- [3] Roegge CS, Schantz SL. Motor function following developmental exposure to PCBs and/or MEHG. *Neurotoxicol Teratol* 2006;28:260–77.
- [4] Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:3–18.
- [5] Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect* 1991;103:73–6.
- [6] Viggiano D. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res* 2008;194:1–14.
- [7] Hatch EE, Nelson JW, Stahlhut RW, Webster TF. Association of endocrine disruptors and obesity: perspectives from epidemiological studies. *Int J Androl* 2010;33:324–32.
- [8] EFSA. European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA. Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA J* 2010;8:1–38.
- [9] Cocco E, Bohn T, Guignard C, Hoffmann L. Rapid analysis of polychlorinated biphenyls in fish by pressured solvent extraction with in-cell clean-up and GC-MS. *Int J Environ Anal Chem* 2011;91:333–47.
- [10] SACN (Scientific advisory committee on nutrition). Advice on fish consumption: benefits and risks; 2004 1–204 [London].
- [11] Tsukamoto K, Kuroki M, editors. *Eels and humans*. Japan: Springer; 2014.
- [12] Stachel B, Christoph EH, Gotz R, Hermann T, Kruger F, Kuhn T, et al. Dioxins and dioxin-like PCBs in different fish from the river Elbe and its tributaries, Germany. *J Hazard Mater* 2007;148:199–209.
- [13] Szlinder-Richert J, Usydus Z, Pelczarski W. Organochlorine pollutants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. *Chemosphere* 2010;80:93–9.
- [14] Blanchet-Letrouve I, Zalouk-Vergnoux A, Venisseau A, Couderc M, Le Bizec B, Elie P, et al. Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: spatial and biological variabilities. *Sci Total Environ* 2014;472:562–71.
- [15] Souci S, Fachmann W, Kraut H. Food composition and nutrition tables. Stuttgart: CRC Press; 2000.
- [16] FAO (Food and Agriculture Organization). Global exports and imports *Anguilla* spp. 1997-2007. FISHSTAT Fisheries Commodities Production and Trade Database; 2009.
- [17] Crook V. Trade in *Anguilla* Species, with a focus on recent trade in European Eel A. *Anguilla*. TRAFFIC Report prepared for the European Commission; 2010.
- [18] Tilson HA, Jacobson JL, Rogan WJ. Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross-species comparisons. *Neurotoxicol Teratol* 1990;12:239–48.
- [19] Calabrese EJ, Baldwin LA. A toxicological basis to derive a generic interspecies uncertainty factor. *Environ Health Perspect* 1994;102:14–7.
- [20] OECD Organization for Economic Co-operation. OECD guideline for the testing of chemicals. Developmental neurotoxicity study; 2007.
- [21] Elnar AA, Diesel B, Desor F, Feidt C, Bouayed J, Kiemer AK, et al. Neurodevelopmental and behavioral toxicity via lactational exposure to the sum of six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls (Σ 6 NDL-PCBs) in mice. *Toxicology* 2012;299:44–54.
- [22] Bouayed J, Desor F, Rammal H, Kiemer AK, Tybl E, Schroeder H, et al. Effects of lactational exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. *Toxicology* 2009;259:97–106.
- [23] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47–60.
- [24] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006;1:848–58.
- [25] de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 1998;394:787–90.
- [26] Baddeley A. Working memory. *Science* 1992;255:556–9.
- [27] Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17501–6.
- [28] Belzung C. Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio WE, Gerlai RT, editors. *Handbook of molecular genetic techniques for brain and behavior research (techniques in the behavioral and neural sciences, vol. 13)*. Amsterdam: Elsevier; 1999. p. 738–49.
- [29] Schantz SL, Gasior DM, Polverejan E, McCaffrey RJ, Sweeney AM, Humphrey HE, et al. Impairments of memory and learning in older adults exposed to polychlorinated biphenyls via consumption of Great Lakes fish. *Environ Health Perspect* 2001;109:605–11.
- [30] Schantz SL, Levin ED, Bowman RE. Long-term neurobehavioral effects of perinatal polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in monkeys. *Environ Toxicol Chem* 1991;10:741–56.
- [31] Corey DA, Juarez de Ku LM, Bingman VP, Meserve LA. Effects of exposure to polychlorinated biphenyl (PCB) from conception on growth, and development of endocrine, neurochemical, and cognitive measures in 60 day old rats. *Growth Dev Aging* 1996;60:131–43.
- [32] Choi AL, Mogensen UB, Bjerve KS, Debes F, Weihe P, Grandjean P, et al. Negative confounding by essential fatty acids in methylmercury neurotoxicity associations. *Neurotoxicol Teratol* 2014;42:85–92.

- [33] Bressa G, Sisti E, Cima F. PCBs and organochlorinated pesticides in eel (*Anguilla anguilla* L.) from the Po Delta. *Mar Chem* 1997;58:261–6.
- [34] de Boer J, Lammertse N, Koekkoek J, van Hattum B. PCB and organochlorine pesticide concentrations in eel increase after frying. *Chemosphere* 2013;90:139–42.
- [35] Roland K, Kestemont P, Henuset L, Pierrard MA, Raes M, Dieu M, et al. Proteomic responses of peripheral blood mononuclear cells in the European eel (*Anguilla anguilla*) after perfluorooctane sulfonate exposure. *Aquat Toxicol* 2013;128–129:43–52.
- [36] Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*.
- [37] Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* 2001;40:1–94.
- [38] Wainwright PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2002;61:61–9.
- [39] Languille S, Aujard F, Pifferi F. Effect of dietary fish oil supplementation on the exploratory activity, emotional status and spatial memory of the aged mouse lemur, a non-human primate. *Behav Brain Res* 2012;235:280–6.
- [40] Bourdineaud JP, Marumoto M, Yasutake A, Fujimura M. Dietary mercury exposure resulted in behavioral differences in mice contaminated with fish-associated methylmercury compared to methylmercury chloride added to diet. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:681016.
- [41] Oken E, Wright RO, Kleinman KP, Bellinger D, Amarasiwardena CJ, Hu H, et al. Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environ Health Perspect* 2005;113:1376–80.
- [42] Palumbo DR, Cox C, Davidson PW, Myers GJ, Choi A, Shamlaye C, et al. Association between prenatal exposure to methylmercury and cognitive functioning in Seychellois children: a reanalysis of the McCarthy Scales of Children's Ability from the main cohort study. *Environ Res* 2000;84:81–8.
- [43] Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, et al. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 2003;361:1686–92.
- [44] Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa M-J, Diez S, Vioque J, Ballester F, et al. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res* 2010;110:96–104.
- [45] Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19:417–28.
- [46] Boucher O, Muckle G, Jacobson JL, Carter RC, Kaplan-Estrin M, Ayotte P, et al. Domain-specific effects of prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead on infant cognition: Results from the environmental contaminants and child development study in Nunavik. *Environ Health Perspect* 2014:310–6.
- [47] Jacobson SW, Fein GG, Jacobson JL, Schwartz PM, Dowler JK. The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory. *Child Dev* 1985;56:853–60.
- [48] EU. Commission Regulation (EU) No. 1259/2011 of 2 December 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for Dioxins, Dioxin-Like PCBs and Non Dioxin-Like PCBs in foodstuffs. Brussels, Belgium: European Commission; 2011.
- [49] Afssa. Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on the establishment of relevant maximum levels for non dioxin-like polychlorobiphenyls (NDL-PCB) in some foodstuffs Afssa - Request No. 2006-SA-0305. Maisons-Alfort 23 October; 2007.
- [50] EFSA European Food Safety Authority. Safety of aluminium from dietary intake. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). *EFSA J* 2008;754:1–34.
- [51] EFSA European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to the tolerable upper intake level of vanadium. *EFSA J* 2004;33:1–22.
- [52] Di Leo A, Cardellicchio N, Giandomenico S, Spada L. Mercury and methylmercury contamination in *Mytilus galloprovincialis* from Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy): risk evaluation for consumers. *Food Chem Toxicol* 2010;48:3131–6.
- [53] FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956-2003). ILSI Press International Life Sciences Institute; 2004.
- [54] FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Summary and conclusions of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 16-25 February 2010. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010 [Geneva, World Health Organization].
- [55] EFSA European Food Safety Authority. Scientific Opinion. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J* 2011;9:1975–93.

1 **Chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating mouse dams causes**
2 **hyperactivity in their offspring**

3

4 **SHORT TITLE: Early-life exposure to PCBs and hyperactivity**

5

6 **Imen Dridi^{1,2}, Nidhal Soualeh^{1,3}, Torsten Bohn⁴, Rachid Soulimani¹, Jaouad Bouayed^{1,*}**

7 ¹Université de Lorraine, Neurotoxicologie Alimentaire et Bioactivité, MRCA/UR
8 AFPA/INRA, BP 4102, 57040 Metz, France

9 ²Unité de Biochimie des Lipides et Interaction des Macromolécules en Biologie
10 (03/UR/0902), Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de
11 Bizerte, Zarzouna, Bizerte, Tunisia

12 ³Laboratory for Research on Biologically Compatible Compounds, Faculty of Dentistry,
13 Rue Avicenne, 5019 Monastir, Tunisia

14 ⁴Luxembourg Institute of Science and Technology, Environmental Research and Innovation
15 Department, 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

16

17 * Corresponding author at: Université de Lorraine, BP 4102, 57040 Metz, France.

18 E-mail addresses: jaouad.bouayed@univ-lorraine.fr (J. Bouayed).

19

20

21 **Abstract**

22 This study examined whether perinatal exposure to polluted eels (*Anguilla anguilla* L.)
23 induces changes in locomotor activity of offspring mice across lifespan (post-natal day (PND)
24 47 to 329), using the open field and the home cage activity tests. Dams were exposed during
25 gestation and lactation, through diets enriched in eels naturally contaminated with pollutants
26 including PCBs. Analysis of the eel muscle focused on the six non-dioxin-like (NDL)
27 indicator PCBs (Σ 6 NDL-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153 and 180). Four groups of dams (n=10
28 per group) received either a standard diet without eels or eels (0.8 mg/kg/day) containing 85,
29 216, or 400 ng/kg/day of Σ 6 NDL-PCBs. The open field test showed that early-life exposure
30 to polluted eels increased locomotion in female offspring of exposed dams but not in males,
31 compared to controls. This hyperlocomotion appeared later in life, at PNDs 195 and 329 (up
32 to 32% increase, $p < 0.05$). In addition, overactivity was observed in the home cage test at PND
33 305: exposed offspring females showed a faster overall locomotion speed (3.6-4.2 cm/s) than
34 controls (2.9 cm/s, $p < 0.05$); again, males remained unaffected. Covered distances in the home
35 cage test were only elevated significantly in offspring females exposed to highest PCB
36 concentrations (3411 \pm 590 cm vs. 1377 \pm 114 cm, $p < 0.001$). These results suggest that early-
37 life exposure to polluted eels containing dietary contaminants including PCBs caused late,
38 persistent and gender dependent neurobehavioral hyperactive effects in offspring mice.
39 Furthermore, female hyperactivity was associated with a significant inhibition of
40 acetylcholinesterase activity in the hippocampus and the prefrontal cortex.

41

42 **Keywords:** Eels; hyperactivity; acetylcholinesterase activity; PCBs; offspring mice; perinatal
43 exposure; late effects.

44

45 **1. Introduction**

46 Several epidemiological studies have emphasized the preventive effect of regular fish
47 consumption, especially fatty fish and fish oils, against cardiovascular diseases (CVD) and
48 related mortality. This is thought to be mainly due to their long chain omega-3
49 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as docosahexaenoic acid (22:6n-3; DHA) and
50 eicosapentaenoic acid (20:5n-3; EPA), able to reduce plasma triacylglycerol levels, blood
51 pressure, platelet aggregation and inflammation [1, 4]. Fish consumption may further exert
52 beneficial effects on fetal development [4-7]. Two portions of fish per week (i.e. 2 times 140
53 g) have been recommended, of which one should be rich in fatty acids [4, 8], such as sardines,
54 salmon, mackerel, and trout.

55 Fish consumption has been recognized to reestablish a more balanced omega 6 to
56 omega 3 fatty acid ratio in humans, even for fetuses and neonates [9]. DHA is essential for the
57 human brain development; DHA is preferentially incorporated into the cell membranes of
58 neuronal cells and the retina, constituting the most abundant omega-3 fatty acid in the brain
59 and retina [10, 13]. The fetus and newborn infants are dependent on a maternal supply of
60 DHA, particularly during the last trimester of pregnancy (via placental transfer), characterized
61 by the brain's growth spurt, and the first postnatal months (via breast-milk or infant formula)
62 [11, 14]. During the entire gestation period, a total of ca. 600 g of essential fatty acids
63 including DHA are transferred from the mother to the fetus [11].

64 In contrast to the health-promoting effects of the naturally occurring ingredients in
65 fatty fish, contaminants constitute a serious human health concern. This is especially true for
66 lipophilic and persistent compounds that accumulate in predatory fish species [4, 15, 16]
67 through the food chain, particularly in their fat tissues. Concentrations of persistent organic
68 pollutants (POPs) such as polychlorinated biphenyls (PCBs), dioxins and polycyclic aromatic
69 hydrocarbons (PAHs) in fish depend further on other factors, such as their migration patterns,

70 fat content, age, the number of times they spawn, size, and feeding habits [4, 17]. Both
71 dioxin-like (DL) and non-dioxin-like (NDL) were observed in fish and fish products. Strong
72 correlations between NDL-PCBs levels and total dioxins + DL-PCBs were found in fish [18].

73 Eel (*Anguilla anguilla* L.) represents a good indicator species for assessing ecosystem
74 health, general environmental levels of pollutants, and PCBs in particular [19, 21]. Eel is a
75 useful bioindicator due to (i) its carnivorous diet (implying a high bioaccumulation for a wide
76 range of contaminants), (ii) its expanded migratory life style (eels begin their life-cycle in the
77 ocean and spend most of their lives in fresh water, returning to the ocean to spawn and die),
78 (iii) its comparably large body size (60-80 cm to 1.5 m in some cases) and (iv) its weight
79 (reaching 3-4 kg, offering sufficient tissues for analyses), and (v) its lifespan (10-15 y on
80 average) [22, 23]. Many European studies have indicated that eels are the most PCB
81 contaminated fish [4, 24]. PCB pollution may be an important factor in the decline of
82 European eels, which are considered endangered [25]. The mean levels of the six non-dioxin-
83 like indicator (NDL) PCBs (28, 52, 101, 138, 153 and 180) in eel muscle has shown to reach
84 up to 2700 ng/g [26]. However, the maximum permitted level (MPL) of the sum of the six
85 indicator PCB congeners ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) in muscle meat of wild caught eel and products is
86 300 ng/g wet weight [27]. The sum of these six NDL-PCBs are used as indicators to estimate
87 total PCBs (DL and NDL-PCBs) in food matrices as it is well accepted that the 6 NDL-PCBs
88 represent about 50% of total NDL-PCBs in food. In addition, $\Sigma 6$ NDL-PCBs occurs in
89 concentrations close to five times higher than the sum of total DL-PCBs [18, 24].

90 Several developmental animal studies have investigated the neurobehavioral effects of
91 PCBs administered either as individual congeners or as commercial mixtures [28, 31].
92 However, studying the effect of PCBs naturally contained in the food matrix (e.g. fatty fish)
93 may be of great interest in order to assess the risk-benefit ratio following the consumption of
94 such human polluted items, as their beneficial ingredients (e.g. omega-3 PUFAs and

95 selenium) might play a role in reducing or counterbalancing the adverse effects of these man-
96 made chemicals.

97 As many studies have shown that motor activity can be affected by early-life exposure
98 to chemicals, resulting in transient or even permanent abnormal later activity levels [28, 30,
99 32-35], the aim of this study was to examine whether gestational and lactational exposure to
100 eels naturally contaminated with PCBs would induce changes in the locomotor activity of
101 offspring mice, following potential effects across their lifespan. For this purpose behavioral
102 models of general activity, including the open field and the home cage activity test were used.
103 In addition, acetylcholinesterase activity was assessed in several brain regions; this enzyme
104 was proposed as a sensitive biological marker for contaminants including PCBs, even at low
105 levels [36]. To the best of our knowledge, this is the first animal study that aimed to
106 investigate the effect of early-life exposure to fish contaminated with PCBs, on rodent
107 offspring activity. The contamination level of eels was assessed, particularly on PCB
108 contamination; metal concentrations including mercury levels in the used eel matrices have
109 been previously determined [3.7].

110

111 **2. Materials and Methods**

112 **2.1. Animals and Breeding**

113 CD1 mice, an outbred strain, were obtained from the breeder (Charles River,
114 France). Mice including females (n = 50) and males (n = 40), aged 9 weeks and weighing
115 30-40 g, were maintained on a standard 12-hr light/dark cycle (lights on starting at 8:00
116 p.m.), temperature controlled conditions ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), and a relative humidity of $55 \pm 10\%$.
117 They were housed in groups of five per sex in standard cages with *ad libitum* access to
118 water and food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France). All animal procedures were

119 carried out in accordance with the European Union (Directive 2010/63/EU), and were
120 approved by the institutional ethics committee of the University of Lorraine
121 (authorization number CELMEA-2013-0010).

122 Mice mating, involving one male with two females per cage, began after a 2-week
123 period of acclimatization. The day on which a vaginal plug was present, fecundated
124 females were housed individually. Once the number of forty pregnant females was
125 obtained (10 dams/group), the mating session was terminated. After a 2-week period of
126 gestation, small pieces of cotton were placed on the lid of each cage to be used for the
127 construction of the maternal nest. The day of parturition was considered to be postnatal
128 day (PND) 1. To prevent litter size bias [29, 35] the recommendations of the OECD [38]
129 were applied in order to equalize pup number among litters (n=10 pups/litter, 5 pups/sex).

130 **2.2. Perinatal exposure to eels containing PCBs:**

131 **2.2.1. Eel matrix**

132 The eel fishing permit was obtained from the Ministry of the Walloon region,
133 Belgium, authorization number DNF/DCP/CD705.1 / Sortie 2007: 31416). Five river
134 yellow eels (la Meuse, Belgium) were stunned and caught with a dip net in spring 2011.
135 In addition, 10 sea reared yellow eels were purchased from Zon-Aquafarming (Helmond,
136 The Netherlands). Biologists of the University of Liège (ULg) identified both river and
137 sea reared eels as *Anguilla anguilla* L. within the autopsy process. Then, eel muscle was
138 sampled, separated in 2 pools according to their origin, freeze dried, mixed and kept at -
139 20°C until paste preparation. Additionally, a portion of each pool was used to determine
140 PCB concentration. Metal concentrations including mercury levels in the eel muscle has
141 been previously described by Dridi et al. [37] It is worth noting that eel matrices may
142 contain other unspecified chemicals, including lipophilic contaminants.

143 **2.2.2. Eel paste preparation**

144 The contaminated food (paste consisting of eels and chow) was prepared by
145 mixing with a kitchen household blender (Robot monofonction Seb Valentin 8553,
146 France) 10 g of powder food pellets (SDS Dietex, St Gratien, France) with 10 ml water,
147 0.5 ml sweep syrup, 1 ml corn oil and 64 mg of lyophilized eel to obtain a homogenous
148 paste. On the following day, the paste was cut to smaller pieces according to the weight
149 of pregnant and nursing females in order to be delivered to mice at 0.8 mg/kg/day. For
150 control mice (n=10), the paste was prepared with the same ingredients cited above but
151 without adding eels, as no PCB-free eels were found.

152 **2.2.3. PCB exposure and doses**

153 Nurturing females were allocated to the 4 experimental groups by stratified
154 randomization; 40 dams ingested daily the standard diet plus paste with or without eels
155 from gestational day (GD) 6 until PND 21 (weaning). The appropriate pastes were filed
156 daily into the cage of each female during the exposure period. Paste was completely eaten
157 by each female and no residual was found in the cage. Thus, in addition to control mice
158 receiving the standard diet plus paste without eels, three groups of female mice (n=10 per
159 group) ingested eel muscle (0.8 mg/kg/day) containing the following doses of Σ 6 NDL-
160 PCBs: 85 ng/kg/d (sea eels only), 216 ng/kg/d (a mix of sea and river eels) and 400
161 ng/kg/day (river eels only).

162 The doses of this study were chosen firstly based on the average daily dietary intake of total
163 NDL-PCBs in humans, which were estimated by EFSA to be in the range of 10-45 ng/kg
164 body weight (b.w.) per day [24]. Secondly, the interspecies uncertainty factor of 10 was also
165 taken into account to extrapolate results from animals to humans, as the interspecies variation
166 has been widely considered in risk assessment procedures, assuming that humans may be 10-

167 fold more sensitive than animals [39, 40]. Thus, mice exposure to 85 ng/kg/day was assumed
168 to reflect low human exposure inferior to the tolerable daily intake (TDI) of $\Sigma 6$ NDL-PCBs,
169 corresponding to 10 ng/kg/day. On the other hand, 400 ng/kg/day would reflect high dietary
170 PCB exposure. For example, some specific subpopulations such as Baltic fishermen have
171 been reported to ingest up to 40 ng/kg of the $\Sigma 6$ NDL-PCBs [24].

172 On PND 21 (weaning), male and female offspring mice were separated into two
173 different rooms to exclude the effect of sexual pheromones at adult age on behavior. Thus, 5
174 same-sex littermates were housed in each cage [38]. Behavioral testing was carried out
175 between 10 a.m. and 1 p.m. Tests were conducted in one male and one female randomly
176 selected from each litter (10 litters/group). Thus, 10 pups/gender/group i.e., a total of
177 $n=20$ /group were analyzed. All behavioral experiments were recorded. The home cage
178 activity was quantified using an Activmeter (Bioseb, Vitrolles, France); locomotion in the
179 open-field test was evaluated by an experienced researcher. The offspring body weight was
180 periodically measured from parturition (PND 1) until PND 330 (i.e. at PNDs: 1, 12, 20, 26,
181 40, 130, 200 and 330).

182 **2.3. Biochemical analyses**

183 For biochemical analysis, a total of 5 mice (offspring) per sex and group were
184 randomly selected from 10 litters/group, euthanized with halothane and decapitated on
185 PND 338. The skull was opened and the brain was placed on cold ice. After removal of
186 the meninges, the cerebellum, prefrontal cortex and hippocampus were collected and
187 weighed. Each tissue was homogenized with a potter in 9 volumes (1:10, w/v) of 20 mM
188 sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing KCl (140 mM). Homogenates were
189 centrifuged at 400 x g for 30 min at 4 °C to discard nuclei and cell debris. The pellet was
190 discarded and the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles was
191 collected, aliquoted and stored at -80°C until analysis.

192 **2.4. NDL-PCB analyses**

193 NDL-PCB contamination level of the 2 eel pools was determined by a fully
194 validated method based on the EN16215:2011 European standard in an ISO 17025
195 accredited laboratory (Center of Analytical Research and Technology, CART, Belgium)
196 Briefly, fat was extracted with a pressurized solvent extraction system (Thermo-Fisher,
197 Palo-Alto, USA), followed by a subsequent purification by liquid chromatography carried
198 out with a PowerPrep automat (FMS, Watertown, MA), and finally analyzed by GC-
199 HRMS on an Autospec Premier (Waters, Millford, MA). Quantitation was achieved by
200 isotope dilution technique using a $^{13}\text{C}_{12}$ labelled analog for each NDL-PCB [37].

201 **2.5. Behavioral tests – open field test and home cage activity test**

202 According to the OECD guidelines for the testing of chemicals [38], weighing and
203 behavioral tests were conducted in one pup of each sex that was randomly selected from
204 each litter i.e., 10/gender/group, thus a total of n=20/group.

205 A circular open field was employed to assess the general locomotor activity of
206 mice on PNDs 47, 195 and 329. The apparatus floor was divided into 36 squares. Mice
207 were individually placed in the frontal part of the apparatus wall, and after 1 min of
208 habituation, the number of squares crossed by all four paws (horizontal activity) was
209 recorded for 5 min [29, 41].

210 Testing activity in the home cage (familiar environment) avoids the interaction
211 with novelty and any induction of the neophobic behavior [42]. This test was performed
212 at PND 305 to evaluate the spontaneous activity of the tested mice using an activimeter
213 (Activimeter; Bioseb, Vitrolles, France). Approximately 24h before testing, each animal
214 was placed in a transparent plastic cage ($12 \times 35 \times 14$ cm) in order to become accustomed
215 to the cage. The floor of the home cage was covered with sawdust and the animal was
216 given unlimited access to food and water. The locomotion was evaluated based on the

217 vibrations of the cage, and infrared photocell detectors recorded rearing movements. The
218 covered distance (cm), the average speed (cm/s), total activity time (s), global movement,
219 including low-speed and high-speed activities, and rears were measured⁴³ over a 15-min
220 period.

221 **2.6. Acetylcholinesterase activity assay**

222 Acetylcholinesterase activity was spectrophotometrically determined (DU 720
223 UV/Visible spectrophotometer, Beckman Coulter, Palo Alto, CA) in offspring mouse tissues
224 (prefrontal cortex, cerebellum and hippocampus) according to Ellman et al [44]. In brief, 0.85
225 ml of phosphate buffer (0.1 M; pH 7.5) was mixed with 0.05 ml of 8 mM 5,5'-dithiobis-(2-
226 nitrobenzoic acid) and 0.05 ml of tissue extract. After 5 min at ambient temperature, the
227 reaction was started by the adding 0.05 ml of acetylthiocholine (8.25 mM) to the mixture.
228 Acetylcholinesterase activity was assessed at 412 nm (at 20°C) by kinetic measurement using
229 molar extinction coefficient (ϵ) 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹. The results were expressed as nanomoles
230 acetylthiocholine hydrolyzed per minute per milligram protein.

231 **2.7. Statistical analyses**

232 When quantitative results followed a Gaussian distribution, analysis of variance
233 (ANOVA) with perinatal exposure to chemically contaminated eels and gender as between-
234 subject fixed-factors, time as a repeated measures variable (within-subject factor) was used to
235 analyze the following dependent variables: body weight and behavioral measures. The
236 dependent variable acetylcholinesterase activity was also analyzed using three-way ANOVA
237 with exposure, gender and brain region as the main factors. The significant effects of the
238 exposure were further assessed using Fisher's protected LSD test when the one-way ANOVA
239 results suggested significant differences. The results were reported as the mean (\pm SEM).
240 When data were not normally distributed, the effects of exposure were assessed using a
241 Kruskal–Wallis non-parametric test followed by Mann–Whitney *U* individual test to compare

242 the exposed groups to the control. The data were reported as the median (IQR). For all
243 statistical evaluations, the level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses
244 were performed using Statview® 4.5 (Abacus Concepts, Inc., Piscataway, NJ, USA).

245

246 **3. Results**

247 **3.1. Body weight**

248 Throughout the 330-postnatal day study period (PNDs: 1, 12, 20, 26, 40, 130, 200 and
249 330), three-way ANOVA showed that there was no significant effect of chemically
250 contaminated eel fed to pregnant and lactating mice on the weight of their offspring:
251 [exposure: $F(3.615) = 0.18, p = 0.9$; exposure \times gender: $F(3.611) = 0.038, p = 0.99$; exposure
252 \times age: $F(21.58) = 1.17, p = 0.26$; exposure \times age \times gender: $F(21.555) = 0.402, p = 0.99$]. As
253 expected, offspring mice gained weight over time, as shown by a significant effect of age
254 [$F(7.611) = 1108.63, p < 0.0001$]. Postnatal evolution of the body weight was also gender-
255 dependent [$F(7.611) = 7.29, p = 0.007$], which reached, to some extent, a plateau starting on
256 PND 130 for both males and females (Figure 1).

257 **3.2. Open field test**

258 In contrast to age [$F(2.216) = 7.65, p = 0.0013$], exposure [$F(3.215) = 0.83, p = 0.83$]
259 and gender [$F(1.217) = 0.59, p = 0.44$] had no significant effect on this performance used as
260 an indicator for general activity. However, three-way ANOVA revealed that the effect of
261 perinatal exposure to eel contaminants on the general activity of F1 mice depended on age and
262 gender, as significant interactions between these main factors were found: [exposure \times age:
263 $F(6.207) = 2.132, p = 0.05$; exposure \times gender $F(3.211) = 5.401, p = 0.0013$]. To explore
264 these interactions, separate one-way ANOVA analyses were performed, and males and

265 females were analyzed separately at each time of testing (PNDs 47, 195 and 329). On PND
266 47, no significant effect of perinatal exposure to contaminants on total ambulation was found
267 in males [$F(3.36) = 1.568, p = 0.21$] or in females [$F(3.36) = 0.45, p = 0.71$]. On PNDs 195
268 and 329, no effect of exposure during the gestational and breast feeding period to
269 contaminants was found in males [$F(3.31) = 0.18, p = 0.90$ and $F(3.31) = 1.32, p = 0.28,$
270 respectively]. However, there was an exposure effect in females [$F(3.32) = 6.85, p = 0.001$
271 and $F(3.30) = 3.40, p = 0.03,$ respectively].

272 *Post-hoc* comparisons revealed that the three studied groups of female mice whose
273 mothers ingested eels containing PCBs at different doses, exhibited significantly more
274 locomotion than controls ($p < 0.05$). Indeed, at PND 195, perinatal exposure by females to 85,
275 218 and 400 ng/kg/day ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) induced hyperactivity compared to controls ($p < 0.05,$
276 $p < 0.01, p < 0.001,$ respectively). This effect was persistent at PND 329, as hyperactivity was
277 also detected in females exposed to 85, 216 and 400 ng/kg/day in comparison to controls
278 ($p < 0.01, p < 0.05, p < 0.05,$ respectively) (Figure 2).

279 **3.3. Home cage activity test**

280 Two-way ANOVA showed significant main effects of early-life exposure to dietary
281 contaminants in eels [$F(3.66) = 4.5, p = 0.01$], and of gender [$F(1.68) = 4.63, p = 0.03$] on the
282 covered distance during the 15 min activity test in the home cage. A significant interaction
283 between these two factors was also found [exposure \times gender: $F(3.62) = 3.31, p = 0.02$].
284 When each gender was examined separately, effect of exposure was found in females [$F(3.30)$
285 $= 5.96, p = 0.002$] but not in males [$F(3.31) = 0.24, p = 0.86$]. *Post-hoc* tests showed that only
286 the distance covered by female mice whose mothers ingested eels containing 400 ng/kg/d ($\Sigma 6$
287 NDL-PCBs) were significantly higher than controls ($p = 0.002$) (Table 1).

288 However, perinatal exposure to contaminants had neither significant effect on the
289 activity time [$F(3.66) = 2.45, p = 0.07$] nor on the number of rearings [$F(3.66) = 0.63, p =$
290 0.59] or global movement [$F(3.66) = 1.76, p = 0.16$]. No interaction between these
291 performances and gender were found. Concerning the speed score of the offspring mice in the
292 home cage, the Kruskal-Wallis test revealed a significant effect of exposure on this
293 performance ($H = 8.25, p = 0.04$). *Post hoc* Mann–Whitney *U* tests showed that, in the three
294 groups exposed to PCBs, the average speed significantly increased compared to controls: $\Sigma 6$
295 NDL-PCBs at 85 ($z = -2.08, p = 0.03$), 216 ($z = -2.09, p = 0.034$) and 400 ng/kg/day ($z = -2.58,$
296 $p = 0.009$) (Table 1).

297 **3.4. Acetylcholinesterase activity**

298 In contrast to the hippocampus [$F(3.36) = 5.77, p = 0.0027$], three-way ANOVA
299 showed no main effects of early-life exposure to chemically contaminated eel on the
300 acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex [$F(3.36) = 0.920, p = 0.44$] and the
301 cerebellum [$F(3.36) = 0.821, p = 0.49$]. Nevertheless, it was revealed that the effect of
302 perinatal exposure to eel contaminants on the acetylcholinesterase activity depended on brain
303 area and gender, as interactions between these main factors were found: [exposure \times brain
304 area: $F(6.96) = 7.202, p < 0.0001$; exposure \times gender $F(3.96) = 5.887, p = 0.001$]. To explore
305 these interactions, separate one-way ANOVA analyses were performed, and thus males and
306 females were analyzed separately, focusing on each brain region. In the prefrontal cortex, no
307 effect of exposure during the gestational and breast feeding period to contaminants was found
308 in males [$F(3.16) = 0.373, p = 0.77$]. However, there was an exposure effect on
309 acetylcholinesterase activity in females [$F(3.16) = 6.559, p = 0.0042$]. In the hippocampus, a
310 main effect of exposure was observed in offspring mice in both males and females [$F(3.16) =$
311 $8.481, p = 0.013$ and $F(3.16) = 6.271, p = 0.0015$, respectively]. In the cerebellum, no effect
312 of exposure was found in males [$F(3.16) = 0.940, p = 0.44$] and females [$F(3.16) = 1.123, p =$

0.36]. *Post-hoc* comparisons revealed that acetylcholinesterase activity was significantly inhibited in the prefrontal cortex of exposed offspring females at the lowest and the highest doses during perinatal periods, in comparison to controls (85 ng/kg/day ($p = 0.01$) and 400 ng/kg/day ($p = 0.0006$)) (Table 2). In addition, *Post-hoc* comparisons revealed that acetylcholinesterase activity was significantly inhibited only in the hippocampus of exposed offspring females (85 ng/kg/day ($p = 0.0043$), 218 ng/kg/day ($p = 0.0042$) and 400 ng/kg/day ($p = 0.0014$) in comparison to controls (Table 2).

320

321 **4. Discussion**

322 The present results demonstrated that early-life exposure to dietary contaminants
323 including PCBs via eels ingested by dams during the gestation and lactation period produces
324 late (i.e. at PNDs 195, 305 and 329) and persistent hyperlocomotion in offspring females but
325 not males, according to two behavioral models of general activity i.e., the open field test and
326 the home cage activity test. Furthermore, locomotor hyperactivity in offspring female mice
327 was associated with an inhibition of acetylcholinesterase activity in the hippocampus and the
328 prefrontal cortex.

329 Throughout pregnancy, the fetus' brain is highly vulnerable to toxic-chemical insults
330 including alcohol, drugs, dietary contaminants and pollutants. Besides this prenatal
331 vulnerability, the human brain presents also a postnatal sensitivity, in particular at the
332 lactational period, constituting a crucial phase for neurodevelopment including
333 neuromaturation [45, 46]. The developing brain is characterized by a not fully established
334 blood-brain barrier, as barrier development is a gradual process that starts in utero and is
335 achieved around 6 months after birth [46]. Therefore, some toxic agents that are normally
336 blocked by the blood-brain barrier can enter the developing brain freely, interfering with

337 specific developmental processes [46]. If a developmental process in the brain is altered, there
338 is little potential for subsequent repair, and the consequences can therefore be permanent or
339 occur later in life [29, 45, 46, 47].

340 In rodent models, the period of ca. PND10-20 constitutes a specific time window
341 during which exposure to toxic agents (e.g., ethanol, manganese, methylmercury (MeHg)) as
342 well as physical agents (e.g., traumatic injury and chronic hypoxia) might provoke locomotor
343 hyperactivity [42]. Our findings highlighted the occurrence of hyperactivity in female
344 offspring mice later in life, which resulted from exposure in utero and early postnatal life
345 (until weaning) of immature brain to contaminants including PCBs. It is hypothesized that
346 when optimal brain development occurs, psychomotor hyperactivity in the body is moderated
347 by a control system that connects the olfactory bulb frontally and the entorhinal cortex
348 caudally (entorhinal–hippocampal–septal–prefrontal cortex–olfactory bulb axis); however
349 the interference with the development of this brain axis during a specific postnatal time
350 window results in overactivity [42].

351 Our results revealed that females whose mothers ingested eel at perinatal periods
352 showed inhibited acetylcholinesterase activity in the hippocampus and the prefrontal cortex in
353 comparison to control females at PND 338. Disturbed functioning of the hippocampus and the
354 prefrontal cortex, belonging to the neural circuit controlling activity, in exposed offspring
355 females might explain their persistent abnormal active behavior. It has also been noted that
356 alterations in the acetylcholinergic system are linked to hyper/hypoactivity [42]. Inhibition of
357 acetylcholinesterase by PCBs has been shown in previous studies [36, 48, 49] including the
358 hippocampus [48, 49], which might be a consequence of induction of cytochrome P450, a
359 source of free radicals [36, 49, 50]. Acetylcholinesterase is an integral part of the
360 acetylcholine system that is involved in many functions in the CNS, including the control of
361 locomotor activity, emotional behavior and cognitive function [51, 33]. However, it is thought

362 that alterations of any neurotransmitter system including dopaminergic, GABAergic,
363 glutamatergic systems may result in increased locomotor activity [42]. In addition to consider
364 lesions or alterations affecting brain regions and neurotransmitter systems as serious factors in
365 the etiology of hyperactivity, hyperlocomotion can also result from other conditions including
366 gene lesions, hormonal alterations (sexual hormones and thyroid hormones), mutation of
367 many growth factors and their receptors [42]. In this study, only exposed offspring females
368 exhibited hyperactive behavior while exposed offspring males displayed a normal ratio of
369 exploratory activity in the two employed behavioral mouse models. Yet, researchers have
370 ignored how early chemical insult interacts with sex and gonadal hormones to produce sex-
371 dependent effects. It is postulated that early insult alters gonadal hormone expression or
372 function [45, 54, 55], or alternatively, hormones do alter the nature of the insult [45, 56].

373 The adverse effects of PCB exposure, including early life, on activity are well
374 established. For example, it has been found that exposure to either Aroclor 1248 or PCB-
375 contaminated St. Lawrence river fish around puberty produced hyperactivity and
376 impulsiveness in adult male rats [57]. In the present study, hyperactivity was detected at late
377 stages, but only in offspring female mice. Thus, an alteration of sexual hormones cannot be
378 excluded. For instance, it has been reported that early-life exposure to PCBs and dioxins is
379 associated with gonadal hormone levels in both genders, including reduced cord serum
380 testosterone and estradiol levels in females and males, respectively [58]. Unlike the home
381 cage test, representing a non-constraining situation as the environment is familiar; the open
382 field test involves constraining situations due to the forced exploration in the paradigm. In this
383 study, mouse exploration into the open field was done at distinct postnatal periods (PNDs 47,
384 195 and 329). Repeated testing in the open field may provoke habituation to the test, which in
385 turn, may diminish the effect of the novelty on the activity. Hyperactivity in offspring female
386 mice was observed at PNDs 195 and 329, suggesting that the eel contaminants significantly

387 increased their walking speed in the open field. Speed activity in the home cage was
388 significantly faster in offspring female mice than controls, suggesting that early-life exposure
389 to eel contaminants induces overactivity in females. The covered distance in the home cage
390 was significantly influenced only in the offspring mice exposed to the highest concentration
391 of PCBs.

392 In addition to PCBs, eel muscle contains other contaminants including MeHg.
393 Remarkably, sea reared eels contained more Hg (550 ng/g dry weight) than river eels
394 (276 ng/g dry weight) [37]. Combined exposure to MeHg and PCBs at early life may
395 result in motor dysfunctions, following interactive effects, in particular on the cerebellum
396 [59]. However, in vitro studies showed that at higher concentrations or longer durations,
397 the two chemicals antagonized each other [59]. Epidemiological studies of developmental
398 PCB and MeHg exposure have mainly focused on cognitive outcomes with some
399 indications on motor impairments [59]. However, several epidemiological studies have
400 demonstrated the negative effect of developmental exposure to PCBs on activity. The
401 offspring of Japanese and Taiwanese pregnant women ingesting rice oil contaminated
402 with PCBs suffered from hypoactivity [60] and hyperactivity [61], respectively. A
403 prospective epidemiological investigation involving children whose mothers resided near
404 a PCB-contaminated harbor in New Bedford (MA) has demonstrated a link between
405 perinatal exposure to organochlorines, and particularly PCBs (including 118, 138, 153
406 and 180), with inattentive and impulsive behaviors.⁶² In this cohort study, only boys were
407 affected. In line with this result, several studies have pointed out that early-life exposure
408 to PCBs constitutes a risk factor for attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) [62,
409 63] and poorer response inhibition in children.⁶⁴

410 In keeping with human data, developmental studies on animal models have also
411 emphasized that early-life exposure to PCBs can result in hyperactive and hypoactive

412 behavioral phenotypes; these behavioral abnormalities, which were sometimes gender
413 specific, remain among the most observed effects of PCBs [32-34, 65, 66]. Supplementary
414 table 1 summarizes some data obtained from early-life exposure to PCBs on activity in animal
415 models [28, 30,32-35, 65-67]; the discrepancy between results is attributed to differences in
416 the time of exposures, the type of mixtures or individual compounds employed, dosage used,
417 etc. For instance, xenobiotics in mixtures, contrary to individual conditions, function
418 additively, synergistically or even antagonistically, resulting in specific responses that vary
419 based on the complexity of the mixtures. The toxicity of NDL-PCBs also depends on
420 differences in their metabolism, absorption and excretion, as less chlorinated congeners such
421 as PCB 52 and 101 are more easily metabolized and excreted than the more persistent ones
422 (PCB 138, 153 and 180) [68]. Dioxins and DL-PCBs share the same mechanism of toxicity,
423 mediated through the aryl hydrocarbon (Ah) receptor. In contrast, NDL-PCBs elicit their
424 effects via multiple toxicity pathways, inducing oxidative stress, suppressing cellular
425 communication and inhibiting apoptosis, without involving Ah receptors [18, 24]. Therefore,
426 PCBs elicit an array of toxicological effects, e.g. carcinogenicity as well as effects on liver,
427 thyroid, immune function and reproduction. PCBs, comprising 209 congeners, are also
428 neurotoxins and endocrine disrupters eliciting neurological, neuroendocrine, and endocrine
429 effects [18, 24]. Thus, behavioral toxicity resulting from PCB effects on the nervous and the
430 hormonal system might have gender-specific consequences.

431 This study has stressed that chemically contaminated eel fed to pregnant and lactating
432 mouse dams causes hyperactivity in their female offspring. We cannot affirm that the
433 hyperactive phenotype exhibited by females at progressive stages is completely attributed to
434 PCBs, as other toxic contaminants can also exist in eels, including heavy metals, other POPs
435 such as dioxins, PAHs, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine
436 pesticides. However, PCBs are plausible hazardous compounds to induce locomotor activity,

437 given the effects seen in earlier studies (see Supplementary table 1). Even though this study
438 assesses the risk-benefit ratio of polluted eel (as fatty fish composition includes “healthy and
439 nutritious” components, such as omega-3 fatty acids and selenium, and “bad” components
440 such as POPs or methylmercury, principally of anthropic origin), we suggest that the gender-
441 specific hyperactivity encountered later in life in mice does have the “behavioral signature” of
442 PCBs.

443 When taking into account the safety factor of 10, which considers uncertainty in
444 extrapolating animal research to human, the doses used in this study reflect realistic human
445 exposure to PCBs. The interspecies uncertainty factor that is widely adopted in the goal of
446 protecting human health, extrapolating results from animals, assumes that humans may be 10-
447 fold more sensitive than animal models [39]. However, it has been debated that mammalian
448 phylogenetic distance between human and most animal models used including rodents
449 represents orders with class differences, and thus a 65 to 87 fold-uncertainty factor rather than
450 the 10-fold factor may be applicable, which is more appropriate when the comparisons
451 represents species-within-genus [39].

452 In conclusion, our results suggest a late hyperactive gender-effect of earlier exposure
453 to contaminated eels. The nutrients ingested via the eels, such as omega-3 fatty acids, did not
454 fully protect against the detrimental effects of contaminants including PCBs. Despite advices
455 given by the public health agencies to reduce eel consumption by estimating a portion as only
456 70 g for a 60 kg adult (unlike other fatty fishes, for which a portion has been estimated to be
457 140 g)⁴, we think that women of childbearing age, pregnant or nursing women, and young
458 children should avoid eel consumption, as they are considered sensitive populations for
459 neurodevelopmental risks.

460

461 **Conflict of interest**

462 The authors declare that there is no conflict of interest.

463

464 **Acknowledgments**

465 This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-CESA-
466 000). River eels used in this study were fished for a scientific study sponsored by the Service
467 Public de Wallonie, DGO “Agriculture, Ressources Naturelles et Environnement, n°
468 10/65/593”. The authors thank Prof. P. Poncin for river eel fishing, Frédéric Desor for his
469 technical assistance, and Dr. Julie Peiffer and Dr. Nelly Jacquet for their help during the
470 development of the home cage activity test. The authors also thank Prof. J-P. Thomé, Prof. G.
471 Eppe and Dr. G. Scholl from the CART of the ULg for their assistance over the analytical
472 behavior.

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482 **References**

- 483 1. Albert, C. M., Hennekens, C. H., O'Donnell, C. J., Ajani, V. J. Carey, U. A., Willett, W.
484 C., Ruskin, J. N. and Manson, J. E. (1998) Fish consumption and risk of sudden cardiac
485 death. *J. A. M. A.* 279, 23–28.
- 486 2. Burr, M. L., Fehily, A. M., Gilbert, J. F., Rogers, S., Holliday, R. M., Sweetnam, P. M.,
487 Elwood, P. C. and Deadman, N. M. (1989) Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on
488 death and myocardial rein farction: diet and rein farctiontrial (DART). *Lancet.* 2,757–761.
- 489 3. Daviglius, M. L., Stamler, J., Orenca, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M.
490 K., Morris, D. R. and Shekelle, B. (1997) Fish consumption and the 30-year risk of fatal
491 myocardial infarction. *New Engl. J. Med.* 336, 1046–1053.
- 492 4. Scientific advisory committee on nutrition (2004) Advice on fish consumption: benefits and
493 risks. London.
- 494 5. Jorgensen, M. H., Hernell, O., Hughes, E. and Michaelsen, K. F. (2001) Is there a relation
495 between docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term
496 infants. *J. Pediatr. Gastro. Enterol. Nutr.* 32, 293–296.
- 497 6. O'Connor, D. L., Hall, R., Adamkin, D., Auestad, N., Castillo, M., Connor, W. E., Connor,
498 S. L., Fitzgerald, K., Groh-Wargo, S., Hartmann, E.E., Jacobs, J., Janowsky, J., Lucas, A.,
499 Margeson, D., Mena, P., Neuringer, M, Nesin, M., Singer, L., Stephenson, T., Szabo, J. and
500 Zemon, V. (2001) Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated
501 fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics.* 108, 359–371.
- 502 7. Olsen, S. F. and Secher, N. J.(2002) Low consumption of seafood in early pregnancy as a
503 risk factor for preterm delivery: prospective cohort study. *B. M. J.* 324, 447–450.
- 504 8. Lichtenstein, A. H., Appel, L. J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H. A.,
505 Franklin, B., Kris-Etherton, P., Harris, W. S., Howard, B., Karanja, N., Lefevre, M., Rudel,

506 L., Sacks, F., Van Horn, L., Winston, M. and Wylie-Rosett, J. (2006) Diet and life style
507 recommendations revision: A scientific statement from the American Heart Association
508 Nutrition Committee *Circulation*;114, 82–96.

509 9. Weaver, K. L., Ivester, P., Chilton, J. A., Wilson, M. D., Pandey, P., Chilton, F. D. (2008)
510 The content of favorable and unfavorable polyunsaturated fatty acids found in commonly
511 eaten fish. *J. Am. Diet. Assoc.* 108, 1178–1185.

512 10. Crawford, M. A. (1993) The role of essential fatty acids in neural development:
513 implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 703S–710S.

514 11. Dangour, A. D. and Uauy, R. (2008) n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for
515 optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17, 185–188.

516 12. Lauritzen, L., Hansen, H. S., Jorgensen, M. H., Michaelsen, K. F. (2001) The essentiality
517 of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina.
518 *Prog. Lipid. Res.* 40, 1–94.

519 13. Wainwright, P. E. (2002) Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental
520 perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 61, 61–69.

521 14. Ryan, A. S., Astwood, J. D., Gautier, S., Kuratko, C. N., Nelson, E. B. and Salem, N. J.
522 (2010) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on neurodevelopment
523 in childhood: a review of human studies. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 82,
524 305–314.

525 15. European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Update of the monitoring of levels of
526 dioxins and PCBs in food and feed. *EFSA J.*, 10, 28–32.

527 16. FAO/WHO, Report of the Joint FAO/WHO (2011). Expert Consultation on the Risks and
528 Benefits of Fish Consumption Rome, Food and Agriculture Organization of the United
529 Nations; Geneva, World Health Organization, 1–50.

- 530 17. Takaomi A. (2013) Bioaccumulation of organochlorines in relation to the life history in
531 the white-spotted charr *Salvelinus leucomaenis*. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 166–176.
- 532 18. EFSA, European Food Safety Authority Scientific report of EFSA. (2010). Results of the
533 monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed. *EFSA J.* 8, 1–38.
- 534 19. Belpair, C. and Goemans, G. (2007) The European eel *Anguilla anguilla*, a reporter of the
535 chemical status for the water framework directive. *Life Environ.* 57, 235–252.
- 536 20. Oliveria Ribeiro, C. A., Vollaire, Y., Coulet, E. and Roche, H. (2008) Bioaccumulation of
537 polychlorinated biphenyl in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve-
538 France. *Environ. Pollut.* 153, 424–431.
- 539 21. Szlinder-Richer, J., Usydus, Z. and Pelcazarski, W. (2010) Organochlorine pollutants eel
540 (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. *Chemosphere.* 80, 93–99.
- 541 22. Bertin, L. (1951) Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité,
542 hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses. Paris Payot.
- 543 23. Pujolar, J. M., Bevacqua, D., Andrello, M., Cpoccioni, F., Ciccotti, E., De Leo, G. A. and
544 Zane, L. (2011) Genetic patchiness in European eel adults evidenced by molecular genetics
545 and populations dynamics modelling. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58, 198–206.
- 546 24. EFSA, European Food Safety Authority (2005) Opinion of the scientific panel on
547 contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of
548 non dioxine-like polychlorinated biphenyles (PCB) in feed and Food. *EFSA J.* 1–137.
- 549 25. Van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., Van Den Berg, H., Flik, G.,
550 Spanings, T., Niemantsverdriet, P., Van den Thillart, G. and Murk, A. (2009) *Aquat. Toxicol.*,
551 92, 213–220.
- 552 26. ANSES - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et
553 du travail (2006). *ANSES J.* 1–160.

554 27. EU, Commission Regulation (EU) No. 1259/2011 of 2 December amending Regulation
555 (EC) No 1881/2006 as Regards maximum levels of dioxins-like PCBs and non-dioxin-like
556 PCBs in foodstuffs. European Commission, Brussels, Belgium. 2011

557 28. Boix, J., Cauli, O., Leslie, H. and Felipo, V. (2011) Differential long-term effects of
558 developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and
559 neurotransmission. Gender dependence and mechanisms involved. *Neurochem. Int.* 58, 69–
560 77.

561 29. Bouayed, J., Desor, F., Rammal, H., Kiemer, A. K., Tybl, E., Schroeder, H., Rychen, G.
562 and Soulimani, R. (2009) Effects of lactational exposure to benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) on
563 postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice.
564 *Toxicology.* 259, 97–106.

565 30. Cauli, O., Piedrafita, B., Lansola, M. and Felipo, V. Gender differential effects of
566 developmental exposure to methyl-mercury, polychlorinated biphenyls 126 or 153, or its
567 combinations on motor activity and coordination. *Toxicology*, 2012, 311, 61–68.

568 31. Holene, E., Nafstad, I., Skaare, J. U. and Sagvolden, T. (1998) Behavioural hyperactivity
569 in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners
570 153 and 126. *Behav. Brain Res.* 94, 213–224.

571 32. Lesmana, R., Shimokawa, N., Takatsuru, Y., Iwasaki, T. and Koibuchi, N. (2014)
572 Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) causes
573 hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environ.*
574 *Toxicol.* 29, 876–883.

575 33. Kuriyama, S. N. and Chahoud, I. (1994) In utero exposure to low-dose 2,3,4,4,5-
576 pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat
577 offspring. *Toxicology.* 202, 185–197.

578 34. Eriksson, P. and Fredriksson, A. (1996) Developmental neurotoxicity of four ortho-
579 substituted polychlorinated biphenyls in the neonatal mouse. *Environ. Toxicol. Pharmacol. L.*
580 155–165.

581 35. Elnar, A. A., Diesel, B., Desor, F., Feidt, C., Bouayed, J., Kiemer, A. K. and Soulimani,
582 R. (2012) Neurodevelopmental and behavioral toxicity of lactational exposure to the sum of
583 six indicator non-dioxin-like-polychlorinated biphenyls ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) in offspring mice.
584 *Toxicology.* 299, 44–54.

585 36. Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W. and Fancey, L. L. (1996) Acetylcholinesterase, an
586 old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper
587 mill in New found land. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 225–231.

588 37. Dridi, I., Leroy, D., Guignard, C., Scholl, G., Bohn, T., Landoulsi, A., Thomé, J-P., Eppe,
589 G., Soulimani, R. and Bouayed, J. (2014) Dietary early-life exposure to contaminated eels
590 does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-
591 maze and the Morris water maze. *J. Nutr. Res.* 12, 1075–1084.

592 38. OECD-Organization for Economic Co-operation and Development (2007). OECD
593 guideline for the testing of chemicals. *Developmental Neurotoxicity Study.*

594 39. Calabrese, E. J and Baldwin, L. A. (1994) A toxicological basis to derive a generic
595 interspecies uncertainty factor. *Environ. Health Persp.* 102, 14–17.

596 40. Tilson H.A., Jacobson, J.L. and Rogan, W.J. (1990) Polychlorinated biphenyls and the
597 developing nervous system cross-species comparisons. *Neurotoxicol. Teratol.* 12, 239–248.

598 41. Bouayed, J., Bohn, T., Tybl, E., Kiemer, A. K. and Soulimani, R. (2012) Benzo[α]pyrene-
599 induced anti-depressive-like behaviour in adult female mice: Role of monoaminergic systems.
600 *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 544–550.

601 42. Viggiano D. (2008) The hyperactive syndrome: Metanalysis of genetic alterations,
602 pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav. Brain*
603 *Res.* 194, 1–14.

604 43. Sluka, K. A., Rasmussen, L. A., Edgar, M. M., O'Donnell, J. M., Walder, R. Y., Kolker,
605 S. J., Boyle, D. L. and Firestein, G. S. (2013) Acid-sensing ion channel 3 deficiency increases
606 inflammation but decreases pain behavior in murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 65, 1194–1202.

607 44. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and
608 rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 7, 88–95.

609 45. Andersen, S. L. (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or
610 window of opportunity. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 3–18.

611 46. Rodier, P. M. (1991) Developing brain as a target of toxicity. *Environ. Health Perspect.*
612 103, 73–76.

613 47. Landrigan, P. J., Sonawane, B., Butler, R. N., Trasande, L., Callan, R. and Droller, D.
614 (2005) Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ. Health*
615 *Perspect.* 113, 1230–1233.

616 48. Selvakumar, K., Bavithra, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P. and Arunakaran, J.
617 (2012) Polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress on rat hippocampus: A
618 neuroprotective role of quercetin. *The Scientific World Journal*, doi:10.1100/2012/980314.

619 49. Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Vengatesh, G., Srinivasan, N., Aruldhas, M. N.
620 and Arunakaran, J., (2008) Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced
621 oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in
622 cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 26,
623 585–591.

624 50. Parkinson, A., Safe, S. H., Robertson, L. W., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M. and
625 Levin, W. (1983) Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide

626 hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats.
627 A study of structure–activity relationships. *J. Biol. Chem.* 258, 5967–5976.

628 51. Everitt, B. J. and Robbins, T. W. (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu.*
629 *Rev. Psychol.* 48, 649–684.

630 52. Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P. and Changeux, J.-P. (2009) Nicotinic
631 receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug*
632 *Discov.* 8, 733–750.

633 53. Wess, J., Eglén, R. M. and Gautam, D. (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant
634 mice provide new insights for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 721–733.

635 54. Edwards, H. E., MacLusky, N. J. and Burnham, W. M. (2000) The effect of seizures and
636 kindling on reproductive hormones in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 753–762.

637 55. McGivern, R. F., Handa, R. J. (1996) Prenatal exposure to drugs of abuse: methodological
638 considerations and effects on sexual differentiation. *NIDA Res. Monogr.* 164, 78–124.

639 56. Allen, N. B., Lewinsohn, P. M. and Seeley, J. R. (1998) Prenatal and perinatal influences
640 on risk for psychopathology in childhood. *Dev. Psycho. Pathol.* 10, 513–529.

641 57. Berger, D.F., Lombardo, J. P., Jeffers, P. M., Hunt, A. E., Bush, B., Casey, A. and
642 Quimby, F. (2001) Hyperactivity and impulsiveness in rats fed diets supplemented with either
643 Aroclor 1248 or PCB-contaminated St. Lawrence river fish. *Behav. Brain Res.* 126, 1–11.

644 58. Cao, Y., Winneke, G., Wilhelm, M., Wittsiepe, J., Lemm, F., Furst, P., Ranft, U., Imohl,
645 M., Kraft, M., Oesch-Bartlomowicz, B. and Kramer, U. (2008) Environmental exposure to
646 dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: results
647 from the Duisburg cohort study. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 11, 30–39.

648 59. Roegge, C. S. and Schantz, S. L. (2006) Motor function following developmental
649 exposure to PCBs and/or MEHG. *Neurotoxicol and Teratol.* 28, 260–277.

650 60. Harada, M. (1976) Intrauterine poisoning: clinical and epidemiological studies and
651 significance of the problem. *Bull. Inst. Constitutional Med. (Suppl)*, 25, 1–60.

652 61. Chen, Y. C., Yu, M. L., Rogan, W. J., Gladen, B. C. and Hsu, C. C. (1994) A 6-
653 yearfollow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *Am. J.*
654 *Public Health*, 84, 415–421.

655 62. Eubig, P. A., Aguiar, A. and Schantz, S. L. (2010) Lead and PCBs as risk factors for
656 attention deficit/hyperactivity disorder. *Environ Health Perspect.* 118, 1654–1667.

657 63. Sagiv, S. K., Thurston, S. W., Bellinger, D. C., Altshul, L. M. and Korrick, S. A. (2012)
658 Neuropsychological measures of attention and impulse control among 8-Year-old children
659 exposed prenatally to organochlorines. *Environ. Health Perspect.* 120, 904–909.

660 64. Stewart, P., Fitzgerald, S., Reihman, J., Gump, B., Lonky, E., Darvill, T., Pagano, J. and
661 Hauser, P. (2012) Prenatal PCB exposure, the corpus callosum, and response inhibition.
662 *Environ. Health Perspect.* 111, 1670–1677.

663 65. Sugawara, N., Nakai, K., Nakamura, T., Ohba, T., Suzuki, K., Kameo, S., Satoh, C. and
664 Satoh, H. (2006) Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to
665 polychlorinated biphenyls in mice. *Arch. Toxicol.* 80, 286–292.

666 66. Colciago, A., Casati, L., Mornati, O., Vergoni, A. V., Santagostino, A., Celotti, F. and
667 Negri-Cesi, P. (2009) Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during
668 pregnancy and lactation in the rat. Part 2: Effects on reproductive parameters, on sex
669 behaviour, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5alpha-
670 reductases in the offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 239, 46–54.

671 67. Tian, Y-H., Kim, S. H., Lee, S-Y. and Jang, C-G. (2001) Lactational and postnatal
672 exposure to polychlorinated biphenyls induces sex-specific anxiolytic behavior and cognitive
673 deficit in mice offspring. *Synapse.* 65, 1032–1041.

674 68. Van Larebeke, N., Hens, L., Schepens, P., Covaci, A., Baeyens, J., Everaert, K.,
675 Bernheim, J. L., Vlietinck, R. and De Poorter, G. (2001) The Belgian PCB and dioxin incident
676 of January-June 1999: exposure data and potential impact on health. *Environ. Health Perspect.*
677 109, 265–273.

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699 **Figure legends**

700 **Figure 1.** Postnatal evolution of the body weight of male (A) and female (B) mice, which
701 were exposed during the perinatal period to chemically contaminated eel containing PCBs, in
702 which the concentration is estimated by PCB indicators ($\sum 6$ NDL-PCBs), present in the eel
703 matrix at 85, 216 and 400 ng/kg, compared to control offspring mice whose mothers received
704 the standard diet without fish (PCB-free diet, n=7-10/sex/group). Body weight of offspring
705 mice was assessed at PNDs: 1, 12, 20, 26, 40, 130, 200 and 330. The data are reported as
706 mean.

707
708 **Figure 2.** The effect of perinatal exposure to chemically contaminated eel containing PCBs,
709 in which the concentration is estimated by PCB indicators ($\sum 6$ NDL-PCBs), present in the eel
710 matrix at 85, 216 and 400 ng/kg, on the motor activity of offspring male (A) and female (B)
711 mice assessed in the open field test on PND 47, PND 195 and PND 329 compared to control
712 mice whose mothers received the standard diet without fish (PCB-free diet). (n=7-
713 10/sex/group). The data are reported as mean \pm SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001
714 significantly different from the control. PND= postnatal day.

715 **Table 1.** The effect of gestational and lactational exposure to PCB-contaminated eel on the motor activity (as assessed in the home cage activity
716 test at PND 305) of offspring mice. PCB concentration in eel was estimated by non-dioxin-like PCB indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) present in the
717 eel matrix at 85, 216 and 400 ng/kg. Effects in offspring mice are compared to control offspring mice whose mothers received the standard diet
718 without eel (PCB-free diet).

Performance tests	$\Sigma 6$ NDL-PCBs (ng/kg/day)							
	0 (control)		85		216		400	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Covered distance (cm)	1652 ± 227	1378 ± 115	1652 ± 189	2224 ± 264	1878 ± 304	2100 ± 207	1856 ± 271	3411 ± 591 ^{***}
Activity time (s)	736 ± 67	839 ± 21	838 ± 20	782 ± 49	825 ± 20	844 ± 20	861 ± 24	889 ± 3
Number of rearing	275 ± 73	265 ± 55	264 ± 34	220 ± 81	192 ± 39	231 ± 29	238 ± 41	302 ± 47
Global movement	460 ± 68	531 ± 45	634 ± 56	495 ± 79	613 ± 44	580 ± 54	560 ± 71	680 ± 40
Average speed (cm/s)	3 [2.47-3.82]	2.9 [2.07-3.25]	3.15 [3-3.75]	4 [*] [3.2-4.92]	3.2 [2.07-3.95]	4.2 [*] [3.2-5]	3.1 [3-4.42]	3.6 ^{**} [3.35-5.55]

719

720 The data are reported as the mean ± S.E.M or median [IQ25 - IQ75]. (n=7-10 mice/gender/group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from the respective control.

721

722

723

724

725

726 **Table 2.** The effect of gestational and lactational exposure to PCB-contaminated eel on the acetylcholinesterase activity (assessed in the
 727 prefrontal cortex, the hippocampus and the cerebellum) of offspring mice. PCB concentration in eel was estimated by non-dioxin-like PCB
 728 indicators ($\Sigma 6$ NDL-PCBs) present in the eel matrix at 85, 216 and 400 ng/kg. Effects in offspring mice are compared to control offspring mice
 729 whose mothers received the standard diet without eel (PCB-free diet).

730

Acetylcholinesterase activity [#]	$\Sigma 6$ NDL-PCBs doses ng/kg/day							
	0 (control)		85		216		400	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Prefrontal cortex	20.53 ± 4.6	21.07 ± 4.44	15.87 ± 4.85	10.86 ± 0.52**	23.77 ± 6.14	14.73 ± 1.57	24.14 ± 8.7	6.07 ± 1.42***
Hippocampus	194 ± 31	381 ± 82	178 ± 35	176 ± 39**	221 ± 58	160 ± 23**	205 ± 23	125 ± 9**
Cerebellum	85.17 ± 21.61	62.45 ± 11.64	62.45 ± 11.64	84.76 ± 12.83	86.15 ± 12.23	76.77 ± 11.69	61.29 ± 6.37	62.37 ± 6.4

731

732 The data are reported as mean ± S.E.M. (n=5 mice/gender/group). [#]nmol acetylcholine hydrolyzed per minute per milligram protein. ***p*<0.01 and ****p*<0.001 significantly different from the
 733 control.

734

735

736

737

738

739

740

741

742 **Supplementary table 1: Compilation of developmental data on PCB effects on motor activity in offspring rodents**

Developmental exposure	PCB congeners or mixtures used	Doses	Effects on motor activity and age of assessment	Biochemical analyses	References
Prenatal exposure	OH-PCB 106 [§]	0.5*, 5* or 50 mg/kg (every 2 nd day from GD3 to GD13)	Gender selective hyperactivity only in male offspring but not in female rats (assessed at PND 28)	Dopamine level* and its receptors D ₁ , D ₂ *-D ₅	[32]
	PCB 118	375µg/kg (single dose at GD6)	Late hyperactivity both in offspring male and female rats (assessed at PND 30-34 and PND 70-74*)	Testosterone and LH levels measured at PND 170	[33]
Postnatal exposure	PCBs : 28*, 52* [#] , 118 or 156	0.18 - 3.6 mg/kg (single dose at PND 10)	*Persistent aberrations in spontaneous behavior (hypoactivity and then hyperactivity in mice, this study was performed only in males) (assessed at 4 months)	The cholinergic nicotinic receptors in the cerebral cortex [#]	[34]
	Arochlor 1254	6-18 mg/kg/day (Dam's exposure PNDs 7-2 plus offspring's exposure PNDs 22-42)	No effects on motor activity neither in males nor in female mice (assessed at PND 35)	Dopamine receptors D ₁ and D ₂ , Dopamine transporter (DTA) and NMDA receptors* in females	[67]
	PCBs : 52 ^φ , 138* ^φ or 180 ^{#,φ}	1mg/kg/day (PND 7 – PND 21)	*Hypoactivity in both male and female offspring rats. # Gender selective hypoactivity occurred only in male but not in female offspring rats (assessed at 4 months of age)	-Extracellular dopamine [#] and glutamate ^φ in the NAcc. -PCB content in striatum and perirenal fat.	[28]
	Σ 6 NDL-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153 and 180	1*, 10* [#] or 100 ng/kg/day (PND 1- PND 21)	Transient gender selective hypoactivity produced only in male but not in offspring female mice (assessed at PND 28*, PND 40 and PND 160)	mRNA expression of 5-HT _{1A} , GABA _{Aα1} , MOR ₁ and RyR ₃ [#] in the cerebellum [#] , the prefrontal cortex and the hippocampus	[35]
Perinatal exposure	PCB 126	100 ng/kg/day (GD 7- PND 21)	Transient gender selective hypoactivity induced only in female but not in offspring rats (assessed at 2*, 3, 5 and 7 months of age)	ND	[30]
	PCB 153	1mg/kg/day (GD 7- PND 21)	*Transient gender selective hypoactivity induced only in females but not in males, then followed by a [#] late hyperactivity in offspring male and female rats (assessed at 2, 3*, 5, 7 [#] months of age)		
	Arochlor 1254	6, 18*, 54 mg/kg (every 3 days from GD 6 – PND 20)	Transient hypoactivity in mice (this study was performed only in males) (assessed at *8 and 9 weeks of age)	ND	[65]
	Σ PCBs: 126, 138, 153 and 180.	10 mg/kg/day (GD 15-GD19) then twice a week till PND21	No effect on activity in both male and female offspring rats	Hypothalamic expression of both aromatase* and the 5α-reductase*	[66]

743

744 In the same study (i.e., the same line in the table), when several congeners were used or even several doses were employed for the same congener or mixture, the symbols: *,# and ϕ indicate the
745 active dose and the corresponding significant effects either on the activity or the measured biochemical parameters. When several assessments of the activity were carried out, these symbols
746 indicate also the age of rodents on which the effect on motor activity occurred. GABA_{A α 1}: Gamma-aminobutyric acid receptor A subunit alpha-1; GD: gestational day; 5-HT_{1A}:5-
747 hydroxytryptamine serotonin receptor 1A; ³Hhydroxylated metabolite of PCB 106; LH: Luteinizing hormone; MOR₁: μ 1-opioïd receptor; NAcc: nucleus accumbens; NMDA: N-methyl-D-
748 aspartic acid; PND: postnatal day; RyR₃: ryanodine receptor 3; ND: not determined.