



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>



INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Doctorale **Ressources Procédés Produits Environnement**

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

mention Sciences Agronomiques

par **Julie PEIFFER**

Etude de la neurotoxicité d'un Polluant Organique Persistant chez le rat :

Effets à court et à long terme de l'inhalation répétée de fluorène sur le développement sensori-moteur du jeune et le comportement à l'âge adulte.

Soutenance publique prévue le 12 décembre 2011

Travail réalisé au sein de l'UR AFPA, INRA USC340

Sous la direction de :

Guido RYCHEN, Professeur (Directeur de thèse)

Henri SCHROEDER, MCF (Codirecteur de thèse)

Membres du jury

<i>Rapporteurs</i>	Guillaume GARÇON	Professeur, Université de Lille 2, Lille
	Astrid NEHLIG	Directeur de Recherche, INSERM U666, Strasbourg
<i>Examineurs</i>	Frédéric COSNIER	PhD., INRS, Vandœuvre-lès-Nancy
	Hélène DESQUEYROUX	Ingénieur, ADEME, Paris
	Guido RYCHEN	Professeur, ENSAIA-INPL, Vandœuvre-lès-Nancy
	Henri SCHROEDER	Maître de Conférences, UHP, Vandœuvre-lès-Nancy

*à mamie Hélène
à Bernadette...*

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA), unité associée à l'INRA (USC340) au niveau des départements AlimH (Alimentation Humaine) et PhASE (Physiologie Animale et Systèmes d'Elevages).

Ce projet a bénéficié du soutien financier de l'ADEME et de la Région Lorraine et a été réalisé en collaboration avec l'Institut National de Recherche et de Sécurité de Vandœuvre-lès-Nancy (INRS) et le Laboratoire de Biosurveillance Humaine Analytique (LAHB) du Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé) de Luxembourg.

Dans un 1^{er} temps, je souhaite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Guido RYCHEN pour m'avoir guidée tout au long de mon travail, pour sa pertinence scientifique, ses conseils avisés et la confiance qu'il m'a accordée jusqu'à la fin de ce travail.

Je remercie tout particulièrement mon co-encadrant, Henri SCHROEDER, de m'avoir proposée d'intégrer le laboratoire, me permettant ainsi de découvrir un monde qui m'était étranger et qui, petit à petit, m'est devenu familier. Merci d'avoir pensé ce projet de thèse et développé les collaborations nécessaires à son accomplissement. Je le remercie également de m'avoir donnée, à de nombreuses reprises, l'occasion de communiquer sur mes travaux.

Un grand merci pour tout l'enseignement que j'ai pu tirer des 4 années ½ passées, duquel j'ai développé des compétences techniques, une méthodologie de travail et une rigueur.

Enfin, merci pour son soutien et sa confiance qui m'ont toujours enthousiasmée.

Je tiens à remercier Astrid NEHLIG, Directeur de Recherche à l'INSERM U666 à Strasbourg, et Guillaume GARÇON, Professeur à l'Université de Lille 2, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse.

Je remercie également Hélène DESQUEYROUX d'avoir accepté d'examiner mon travail et de faire partie des membres de mon jury.

A l'INRS,

Je remercie Marie-Thérèse BRONDEAU et Benoît COSSEC de m'avoir permis de réaliser ce travail conjointement avec l'INRS.

Je remercie également vivement Frédéric COSNIER, pour sa disponibilité et sa réactivité, son ouverture d'esprit et sa sympathie.

Un énorme merci à Marie-Jo DECRET pour sa gentillesse, sa patience et l'intérêt qu'elle a montré pour mes travaux. Son aide infinie et sa présence ont apporté une grande valeur ajoutée à mon travail.

Je souhaite également remercier Hervé NUNGE, qui a grandement contribué au développement du modèle d'exposition par inhalation, pour ses explications et sa gentillesse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du département « Polluants et Santé – Unité de Services Inter-Laboratoires » avec lesquelles j'ai pu travailler, Sylvie MICHAUX, Stéphane GROSSMANN, Céline BLANCHARD, Lionel DUSSOUL et Jean-Claude GONDREXON.

Au LAHB,

Je remercie vivement Brice APPENZELLER, pour avoir permis la collaboration entre nos deux laboratoires.

Je remercie aussi particulièrement Nathalie GROVA et Guillaume SALQUÈBRE qui ont développé la technique analytique ayant permis de doser le fluorène et ses métabolites au niveau cérébral.

A l'UR AFPA,

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont participé aux expérimentations, Andrée MOREL, Pamela HARTMEYER, Marie-France SCHOEN et Jean-Charles OLRÉ de l'équipe « Micropolluants et Résidus dans la Chaîne Alimentaire (MRCA) », ainsi que Laurent MICLO, Jean-Michel GIRARDET et Chantal POIRSON de l'équipe « Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides (PB2P) ».

Je remercie également Michael MESSAOUDI, directeur de la société ETAP à Vandœuvre-lès-Nancy, et Sophie HIDALGO d'avoir contribué aux résultats de mes travaux.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont participé aux réunions du comité de pilotage de thèse, pour leurs critiques qui ont contribué à faire avancer mon travail, Pascaline BOUILLAUD-KREMARIK et Alain PARIS.

Je remercie aussi Didier DESOR pour tous ses enseignements, sa présence et son élégance dans les conseils qu'il m'a donnés au cours de ces années.

Un énorme merci aux étudiants que j'ai rencontrés durant cette période, qui ont plus que largement contribué à me faire avancer.

En particulier Nicolas, qui m'a initiée au travail de recherche, à de nombreuses techniques et à l'analyse statistique.

Un merci tout particulier à Guillemette, pour son irremplaçable compagnie et complicité, sans qui je n'aurais pas imaginé aller au bout de ce travail...

Un grand merci à Agnès, pour son incroyable disponibilité et efficacité, à Lei, Stéphanie, Marie-Do et tous les thésards du laboratoire et d'ailleurs qui m'ont beaucoup apportée.

Tout aussi particulièrement je remercie les stagiaires, pour leur enthousiasme, leur investissement et leur personnalité, qui ont contribué à rendre cette période encore plus enrichissante, Amaury, Anne, Anne-Sophie, Aurélie V, Aurélie W, Claire C, Claire H, Delphine, Gaëlle, Guillaume, Hed, Hoël, Jean-Daniel, Jean-Luc, Jessica, Moussa, Nicolas C, Nurgul, Paul, Romain, Sandra, Sophie D, Sophie L et Yoann.

Un énorme merci à mes parents et à ma grand-mère d'avoir été aussi patients, toujours présents et de m'avoir durant tout ce temps soutenue dans mon travail.

Je remercie tous les amis qui m'ont écoutée, supportée, rassurée, ont su patienter, et m'ont ainsi aidée à atteindre mon objectif, Jean-Clément, Chloé, Mélanie, Anne-Claire et Raphaël.

Enfin, merci à toutes ces personnes de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail, d'y avoir contribué et de m'y avoir encouragée.

Abréviations

ADEME : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

ANOVA : analyse de la variance

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

B(a)P: benzo(a)pyrène

BO : branche ouverte

BCO : boîte claire/obscur

BF : branche fermée

BHE : barrière hémato-encéphalique

CAFE : Clean Air For Europe

CC : compartiment clair

CEE-NU : Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe

CERCLA : Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act

CITEPA : Centre Interprofessionnel d'Etudes de la Pollution Atmosphérique

CORT : corticostérone

CS : compartiment sombre

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DL₅₀ : dose létale 50

E.S.M. : erreur standard à la moyenne

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HCB : hexachlorobenzènes

HPA : hypothalamo-hypophyse-corticotrope

HPLC : chromatographie liquide haute performance

HSDB : Hazardous Substances Data Bank

IARC : International Agency for Research on Cancer

IBE : indicateurs biologiques d'exposition

IFEN : Institut Français de l'Environnement

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

INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité

i.p. : intrapéritonéale

IPCS : International Programme on Chemical Safety

LCS : labyrinthe en croix surélevé

LOAEL : lowest observed adverse effect level

LY : labyrinthe en Y

NOAEL : no observed adverse effect level

MRL : minimal risk level

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OF : open-field

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAE : Programme d'Action pour l'Environnement

PBDE : polybromodiphényléthers

PCB : polychlorobiphényles

PCDD : polychlorodibenzo-p-dioxines

PCDF : polychlorodibenzo-furanes

PM : matière particulaire

PN : âge postnatal

PNSE : Plan National Santé-Environnement

ppb : partie par billion

POP : polluants organiques persistants

QI : quotient intellectuel

REACH : Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals

RfD : reference dose

SFMT : Société Française de Médecine du Travail

SNC : système nerveux central

TESLA : test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif

TFA : acide trifluoroacétique

UR AFPA : Unité de Recherche « Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux »

USEPA : United States Environmental Protection Agency

VLEP : valeurs limites d'exposition professionnelle

ZC : zone centrale

ZI : zone intermédiaire

ZP : zone périphérique

Liste des tableaux, figures & photos

TABLEAUX

Tableau 1 :	Liste nominative des POP (ADEME 2004) et leurs seuils de rejet dans l'air (Journal officiel de l'Union européenne 2006)	4a
Tableau 2 :	Liste des 16 HAP classés prioritaires par l'USEPA	7a
Tableau 3 :	Concentrations atmosphériques en HAP mesurées en différents lieux dans le monde	8a, b
Tableau 4 :	Estimations des quantités maximales de HAP inhalées ($\mu\text{g}/\text{j}$ / personne)	9a
Tableau 5 :	Résumé des études des effets d'expositions périnatales aux HAP réalisées chez l'animal	10a
Tableau 6 :	Résumé des études des effets d'expositions aux HAP réalisées chez l'animal adulte	10b
Tableau 7 :	Résumé des études épidémiologiques des effets d'expositions aux HAP réalisées chez l'enfant	10c
Tableau 8 :	Résumé des études épidémiologiques des effets d'expositions aux HAP réalisées chez l'adulte	10d
Tableau 9 :	Concentrations atmosphériques des 16 HAP listés par l'USEPA (INERIS 2005)	11a
Tableau 10 :	Calcul des quantités de fluorène inhalées par jour ou au cours d'une exposition de 6h	27a
Tableau 11 :	Résumé des caractéristiques des tests développementaux employés (<i>D'après Gelly 1979, Altman et Sudarshan 1975</i>)	38a
Tableau 12 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie <i>i.p.</i> sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé	58a
Tableau 13 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie <i>i.p.</i> sur le comportement lié à l'activité dans l'open-field	58b
Tableau 14 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie <i>i.p.</i> sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches	59a
Tableau 15 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie <i>i.p.</i> sur les capacités d'apprentissage dans le TESLA	59b
Tableau 16 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie <i>i.p.</i> sur le poids relatif des organes (% du poids corporel)	60b
Tableau 17 :	Concentrations cérébrales de fluorène et de 3 de ses métabolites mono-hydroxylés après administration répétée par voie <i>i.p.</i> (ng/g de tissu)	60c
Tableau 18 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé	61a
Tableau 19 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur le comportement lié à l'activité dans l'open-field	61b
Tableau 20 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches	61c
Tableau 21 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur les capacités d'apprentissage dans le TESLA	62a
Tableau 22 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur le poids relatif des organes (% du poids corporel)	63a
Tableau 23 :	Concentrations cérébrales de fluorène et de 3 de ses métabolites mono-hydroxylés après administration répétée par voie orale (ng/g de tissu)	63b
Tableau 24 :	Concentrations cérébrales de fluorène et de 3 de ses métabolites mono-hydroxylés après inhalation répétée de fluorène (ng/g de tissu)	72c
Tableau 25 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur la physiologie des animaux	73b

Tableau 26 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé	73c
Tableau 27 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur le comportement lié à l'activité dans l'open-field	74a
Tableau 28 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur les capacités de mémorisation à court terme dans le labyrinthe en Y	74b
Tableau 29 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches	74c
Tableau 30 :	Effets du stress de contention imposé par le dispositif d'exposition par voie nasale sur la physiologie des animaux	75b
Tableaux 31a et 31b :	Effets du stress de contention imposé par le dispositif d'exposition par voie nasale sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé (31a) et à l'activité dans l'open-field (31b)	75c
Tableaux 31c et 31d :	Effets du stress de contention imposé par le dispositif d'exposition par voie nasale sur les capacités de mémorisation à court terme dans le labyrinthe en Y (31c) et sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches (31d)	75d
Tableau 32 :	Données relatives à la reproduction	86c
Tableau 33 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur le comportement du jeune rat dans le test de coordination locomotrice	89a
Tableau 34 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25	89b
Tableau 35 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé	90a
Tableau 36 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field	90b
Tableau 37 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur	91a
Tableau 38 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y	91b
Tableau 39 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches	92a
Tableau 40 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur le développement neuromoteur du jeune rat	93a
Tableau 41 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25	94b
Tableau 42 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé	95a
Tableau 43 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field	95b
Tableau 44 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur	95c
Tableau 45 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y	96a
Tableau 46 :	Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches	96b
Tableau 47 :	Données relatives à la reproduction	100c
Tableau 48 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur le comportement du jeune rat dans le test de coordination locomotrice	102c
Tableau 49 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25	103a
Tableau 50 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes	103c
Tableau 51 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé	104a

Tableau 52 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field	104b
Tableau 53 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur	105a
Tableau 54 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y	105b
Tableau 55 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches	105c
Tableau 56 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur le développement sensori-moteur du jeune rat	106a
Tableau 57 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25	107b
Tableau 58 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes	108a
Tableau 59 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé	108d
Tableau 60 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field	109a
Tableau 61 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur	109b
Tableau 62 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y	109c
Tableau 63 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches	109d
Tableau 64 :	Résumé des effets comportementaux et physiologiques induits après administration répétée de fluorène par voie <i>i.p.</i> , orale ou inhalatoire	118a
Tableau 65 :	Résumé des effets comportementaux induits après l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante ou allaitante sur l'activité comportementale à l'âge adulte	126a

FIGURES

Figure 1 :	Pourcentages des émissions atmosphériques des POP par secteur en France métropolitaine en 2008	6a
Figure 2 :	Périodes critiques du développement humain	26a
Figure 3 :	Développement des capacités sensorielles et motrices chez le rat	26b
Figure 4 :	Développement cérébral de différents mammifères	26c
Figure 5 :	Choix des concentrations de fluorène testées dans les études d'exposition par inhalation	27a
Figure 6 :	Echelle d'évaluation du développement neuromoteur chez le rat	37a
Figure 7 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie <i>i.p.</i> sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des animaux	60a
Figure 8 :	Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des animaux	62b
Figures 9a et 9b :	Concentrations de fluorène générées dans la cellule contaminée quotidiennement pendant 14 jours à 1,5 ppb (9a) et à 150 ppb (9b)	72a
Figures 10a et 10b :	Moyennes de la température (10a) et de l'humidité relative (10b) relevées dans les cellules d'exposition des animaux des quatre groupes	72b
Figure 11 :	Evolution du poids corporel des animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb tout au long de l'étude	73a

Figure 12 :	Evolution du poids corporel des animaux des deux groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) tout au long de l'étude	75a
Figures 13a et 13b :	Concentrations de fluorène générées dans les cellules contaminées quotidiennement pendant 17 jours à 1,5 ppb (13a) et 16 jours à 150 ppb (13b)	86a
Figures 14a et 14b :	Moyennes de la température (14a) et de l'humidité relative (14b) relevées dans les cellules d'exposition des animaux des quatre groupes	86b
Figures 15a et 15b :	Pourcentage de réussite au test de retournement (15a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb pour se retourner (médianes et quartiles) (15b)	87a
Figures 16a et 16b :	Pourcentage de réussite au test d'agrippement (16a) et angle atteint par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles) (16b)	87b
Figures 17a et 17b :	Pourcentage de réussite au test du <i>cliff avoidance</i> (17a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (17b)	87c
Figures 18a et 18b :	Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (18a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (18b)	88a
Figure 19 :	Temps de suspension des animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles)	88b
Figure 20 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN19	88c
Figure 21 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb ayant les yeux ouverts entre PN12 et PN16	88c
Figures 22a, 22b et 22c :	Pourcentage de mères des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb ayant construit un nid à PN3 (22a), PN6 (22b) et PN9 (22c)	89c
Figure 23 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN19	94a
Figure 24 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) ayant les yeux ouverts entre PN12 et PN16	94a
Figures 25a, 25b et 25c :	Pourcentage de mères des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) ayant construit un nid à PN3 (25a), PN6 (25b) et PN9 (25c)	94c
Figures 26a et 26b :	Concentrations de fluorène générées dans les cellules contaminées quotidiennement pendant 17 jours à 1,5 ppb (26a) et à 150 ppb (26b)	100a
Figures 27a et 27b :	Moyennes de la température (27a) et de l'humidité relative (27b) relevées dans les cellules d'exposition des animaux des quatre groupes	100b
Figures 28a et 28b :	Pourcentage de réussite au test de retournement (28a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb pour se retourner (médianes et quartiles) (28b)	100d
Figures 29a et 29b :	Pourcentage de réussite au test d'agrippement (29a) et angle atteint par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles) (29b)	101a
Figures 30a et 30b :	Pourcentage de réussite au test du <i>cliff avoidance</i> (30a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (30b)	101b
Figures 31a et 31b :	Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (31a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (31b)	101c
Figure 32 :	Temps de suspension des animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles)	102a
Figure 33 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN15	102b
Figure 34 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb ayant les yeux ouverts entre PN12 et PN17	102b
Figures 35a, 35b et 35c :	Pourcentage de mères des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb ayant construit un nid à PN3 (35a), PN6 (35b) et PN9 (35c)	103b
Figure 36 :	Pourcentage de mères des groupes Témoins (contenus), 1,5 et 150 ppb ayant construit un nid à PN4, PN7 et PN10	103d

Figure 37 :	Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des jeunes	103e
Figure 38 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN14	107a
Figure 39 :	Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) ayant les yeux ouverts entre PN13 et PN16	107a
Figures 40a, 40b et 40c :	Pourcentage de mères des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) ayant construit un nid à PN3 (40a), PN6 (40b) et PN9 (40c)	107c
Figure 41 :	Pourcentage de mères des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) ayant construit un nid à PN4, PN7 et PN10	108b
Figure 42 :	Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des jeunes	108c

PHOTOS

Photo 1 :	Chambres d'inhalation à l'INRS	27c
Photo 2 :	Rat placé dans un tube d'exposition par voie nasale	27c
Photo 3 :	Test de retournement	38b
Photo 4 :	Réflexe d'agrippement	39a
Photo 5 :	<i>Cliff avoidance</i>	40a
Photo 6 :	Réaction anti-gravitaire	40b
Photo 7 :	Test de suspension	41a
Photo 8 :	Coordination locomotrice	42a
Photo 9 :	Open-field pour jeune rat	43a
Photo 10 :	Observation de l'ouverture des yeux	44a
Photo 11 :	Construction du nid	45a
Photo 12 :	Labyrinthe en croix surélevé	46a
Photo 13 :	Open-field chez l'adulte	47a
Photo 14 :	Boîte claire/obscur	48a
Photo 15 :	Labyrinthe en Y	49a
Photo 16 :	Labyrinthe radial à 8 branches	49b
Photo 17 :	Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif	50a

Table des matières

SECTION INTRODUCTIVE

I. Contexte de l'étude	1
I.1. Généralités sur la pollution atmosphérique	1
I.2. Enjeux sanitaire et environnemental	2
I.3. Les Polluants Organiques Persistants	4
I.3.1. Propriétés physico-chimiques	4
I.3.2. Cadre réglementaire.....	4
I.3.3. Sources et situations d'émissions	6
I.4. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	5
I.4.1. Propriétés physico-chimiques	5
I.4.2. Sources et situations d'émissions	5
I.4.3. Voies d'entrées de la contamination	5
I.4.4. Caractéristiques du métabolisme	5
I.4.5. Toxicologie	5
I.5. Le fluorène	5
I.5.1. Critères de choix.....	5
I.5.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	5
I.5.3. Sources d'exposition et utilisations	12
I.5.4. Toxicologie	12
II. Définition de la problématique de l'étude	13
II.1. Populations à risque	13
II.1.1. Individus en développement	13
II.1.1.1. Sensibilité particulière	13
II.1.1.2. Caractérisation des expositions	14
II.1.1.3. Transfert mère-jeune des composés chimiques.....	15
II.1.2. Personnes exposées en milieu professionnel.....	17
II.1.2.1. Caractérisation des expositions	17
II.1.2.2. Lien avec l'individu en développement	17
II.2. Particularités de la voie inhalatoire	18
II.3. Effets de la pollution liée aux HAP	18
II.3.1. Neurotoxicité chez l'adulte	18
II.3.2. Neurotoxicité prénatale.....	20
II.3.3. Effets reprotoxiques	22
III. Modèle d'étude	23
III.1. Evaluation des effets neurotoxiques	23
III.2. Caractéristiques de l'expertise animale	25
III.2.1. Extrapolation des données.....	25
III.2.2. Particularités développementales.....	26
III.3. Modèle d'exposition	12
III.3.1. Choix des concentrations	12
III.3.2. Dispositif d'exposition	12
III.3.3. Contrainte liée à l'exposition par voie nasale.....	28

SECTION METHODOLOGIQUE

I. Introduction	31
I.1. Tests à l'âge adulte	31
I.2. Tests du développement sensori-moteur	32
II. Considérations méthodologiques	35
II.1. Tests à l'âge adulte	35
II.2. Tests du développement sensori-moteur	36
III. Procédure des tests	31
III.1. Tests du développement sensori-moteur	31
III.1.1. Evaluation du développement locomoteur	31
III.1.1.1. Le réflexe de retournement	31
III.1.1.2. Réaction d'agrippement	31
III.1.1.3. Cliff avoidance	31
III.1.1.4. Réaction anti-gravitaire	31
III.1.1.5. Test de suspension	31
III.1.1.6. Test de coordination locomotrice	31
III.1.1.7. Open-field	31
III.1.2. Evaluation de la maturation des systèmes sensoriels	31
III.1.2.1. Test du sursaut au bruit	31
III.1.2.2. Ouverture des yeux	31
III.2. Evaluation du comportement maternel	31
III.2.1. Construction du nid	31
III.2.2. Ramassage des jeunes	31
III.3. Tests à l'âge adulte	31
III.3.1. Labyrinthe en croix surélevé	31
III.3.2. Open-field	31
III.3.3. Boîte claire/obscur	31
III.3.4. Labyrinthe en Y	31
III.3.5. Labyrinthe radial à 8 branches	31
III.3.6. Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif	31

OBJECTIFS de la THESE

SECTION EXPERIMENTALE

Chapitre 1: Toxicité neurocomportementale de l'administration répétée de 28 jours de fluorène par voie intrapéritonéale ou par voie orale chez le rat adulte

I. Objectifs	54
II. Matériel et méthodes	55
II.1. Protocole expérimental	55
II.1.1. Animaux.....	55
II.1.2. Traitements.....	55
II.2. Analyse comportementale	56
II.3. Mesures physiologiques	56
II.4. Quantification des concentrations de fluorène et de ses métabolites au niveau cérébral	56
II.5. Analyse statistique	57
III. Résultats	58
III.1. Etude des effets du fluorène après administration répétée par voie i.p.	58
III.1.1. Analyse comportementale	58
III.1.1.1. Labyrinthe en croix surélevé.....	58
III.1.1.2. Open-field	58
III.1.1.3. Labyrinthe radial à 8 branches	54
III.1.1.4. Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif.....	54
III.1.2. Mesures physiologiques	54
III.1.2.1. Poids corporel.....	54
III.1.2.2. Poids des organes	54
III.1.3. Quantification des concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites	54
III.1.4. Conclusion	54
III.2. Etude des effets du fluorène après administration répétée par voie orale	54
III.2.1. Analyse comportementale	54
III.2.1.1. Labyrinthe en croix surélevé.....	54
III.2.1.2. Open-field	54
III.2.1.3. Labyrinthe radial à 8 branches	54
III.2.1.4. Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif.....	54
III.2.2. Mesures physiologiques	54
III.2.2.1. Poids corporel.....	54
III.2.2.2. Poids des organes	63
III.2.3. Quantification des concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites	63
III.2.4. Conclusion	63
IV. Discussion	64
IV.1. Effets du fluorène	64
IV.2. Comparaison des deux voies d'entrées	64
IV.3. Concentrations cérébrales du fluorène et de ses métabolites	65

Chapitre 2: Toxicité neurocomportementale de l'exposition aérienne répétée de 14 jours au fluorène chez le rat adulte

I. Objectifs	66
II. Matériel et méthodes	67
II.1. Protocole expérimental	67
II.1.1. Animaux.....	67
II.1.2. Exposition.....	67
II.1.3. Génération de fluorène	68
II.1.4. Métrologie atmosphérique	68
II.1.5. Quantification des concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites	69
II.1.6. Evaluation du stress	69
II.1.7. Dosage de la corticostérone plasmatique	70
II.2. Mesures physiologiques	71
II.3. Analyse comportementale	71
II.4. Analyse statistique	71
III. Résultats	72
III.1. Concentrations atmosphériques de fluorène	72
III.2. Concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites	72
III.3. Mesures physiologiques	63
III.3.1. Poids corporel.....	63
III.3.2. Poids des organes	63
III.3.3. Dosages de la corticostérone plasmatique	63
III.4. Analyse comportementale	63
III.4.1. Labyrinthe en croix surélevé.....	63
III.4.2. Open-field	63
III.4.3. Labyrinthe en Y.....	63
III.4.4. Labyrinthe radial à 8 branches	63
III.5. Effets du stress de contention	63
IV. Discussion	76
IV.1. Concentrations atmosphériques de fluorène	76
IV.2. Concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites	76
IV.3. Effets comportementaux	77
IV.4. Effets du stress de contention	78

Chapitre 3: Etude des effets d'une exposition aérienne chronique au fluorène chez la rate gestante ou allaitante. Effets neurocomportementaux à court et à long terme chez le jeune.

I. Objectifs	81
II. Matériel et méthodes	82
II.1. Protocole expérimental	82
II.1.1. Animaux.....	82
II.1.2. Accouplements.....	82
II.1.3. Expositions	83
II.1.3.1. Etude 1 : exposition au cours de la gestation	83
II.1.3.2. Etude 2 : exposition au cours de l'allaitement.....	83
II.1.4. Modèle d'exposition	84

II.1.5. Evaluation du stress	84
II.2. Effets de l'exposition au fluorène	84
II.2.1. Tests neurodéveloppementaux	84
II.2.2. Tests à l'âge adulte	84
II.2.3. Poids corporel	85
II.3. Analyse statistique	85
III. Résultats	86
III.1. Effets de l'inhalation de fluorène par la rate gestante sur le développement neurocomportemental du jeune	86
III.1.1. Métrologie atmosphérique	86
III.1.2. Reproduction	86
III.1.3. Effets de l'exposition au fluorène	76
III.1.3.1. Tests neurodéveloppementaux	76
III.1.3.2. Comportement maternel	76
III.1.3.3. Poids corporel	76
III.1.3.4. Tests à l'âge adulte	76
III.1.4. Effets du stress de contention	76
III.1.4.1. Tests neurodéveloppementaux	76
III.1.4.2. Comportement maternel	76
III.1.4.3. Poids corporel	76
III.1.4.4. Tests à l'âge adulte	76
III.1.5. Conclusion	97
III.1.5.1. Effet de l'exposition au fluorène	97
III.1.5.2. Effet du stress prénatal de contention	99
III.2. Effets de l'inhalation de fluorène par la rate allaitante sur le développement neurocomportemental du jeune	100
III.2.1. Métrologie atmosphérique	100
III.2.2. Reproduction	100
III.2.3. Effets de l'exposition au fluorène	100
III.2.3.1. Tests neurodéveloppementaux	100
III.2.3.2. Comportement maternel	97
III.2.3.3. Poids corporel	97
III.2.3.4. Tests à l'âge adulte	97
III.2.4. Effets du stress de contention	97
III.2.4.1. Tests neurodéveloppementaux	97
III.2.4.2. Comportement maternel	97
III.2.4.3. Poids corporel	97
III.2.4.4. Tests à l'âge adulte	97
III.2.5. Conclusion	110
III.2.5.1. Effets de l'exposition au fluorène	110
III.2.5.2. Effets de l'exposition postnatale à la contention	112
IV. Discussion	114
IV.1. Effets du fluorène	114
IV.2. Effets de la contention	114

DISCUSSION, CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

I. Discussion générale	116
I.1. Originalité du modèle d'étude	116
I.2.1. Quantification de fluorène et de ses métabolites au niveau cérébral	117
I.2.2. Sur le développement neurocomportemental	118
I.2.2.1. Reproduction	118
I.2.2.2. Effets sur le développement sensori-moteur et le comportement à l'âge adulte	119
I.2.2.3. Lien entre effets précoces et effets à l'âge adulte	120
I.2.3. Effets de l'exposition à faibles doses	121
I.2.4. Mécanismes d'action	123
I.2.4.1. Effets liés à la voie d'entrée de la contamination	123
I.2.4.2. Toxicité de la molécule mère ou des métabolites	124
I.2.4.3. Effets des perturbateurs endocriniens	125
I.2.4.4. Effets de l'exposition à un mélange de composés	126
II. Conclusion générale et perspectives	130

Bibliographie

Valorisation scientifique

SECTION INTRODUCTIVE

I. Contexte de l'étude

I.1. Généralités sur la pollution atmosphérique

A l'heure actuelle les phénomènes de pollution sont omniprésents dans l'environnement. Ils traduisent la présence de substances à des concentrations trop élevées par rapport à la norme pouvant altérer le fonctionnement des différents écosystèmes. En particulier, la pollution atmosphérique se caractérise par des concentrations dans l'air ambiant de gaz ou de particules susceptibles d'induire des effets néfastes sur la santé ou sur l'environnement.

Précisément, au cœur de l'atmosphère (de 0 à 50 km d'altitude), siège permanent d'interactions physico-chimiques responsables de la dégradation du milieu, la troposphère (de 0 à 8-15 km d'altitude) est la zone où sont produits et où évoluent les polluants (Bidleman 1988). En fonction des sources d'émissions, de la nature des composés et des transformations qu'ils peuvent subir, la pollution de l'air est prise en compte à plusieurs échelles. La pollution atmosphérique locale est due aux composés directement émis par les sources, appelés polluants « primaires », contaminant ainsi majoritairement les lieux situés à proximité des activités émettrices. A l'échelle globale, les polluants subissent des modifications sous l'effet des conditions météorologiques (vent, gradients de température), contribuant à la formation de nouveaux polluants, dits « secondaires », et à leur diffusion sur de longues distances. Parmi ces substances, on trouve des agents chimiques, physiques ou microbiologiques, de diverses origines et aux durées de vie variables dans l'environnement, qui peuvent générer des situations polluantes très hétérogènes.

On distingue de plus la pollution formée de composés gazeux, principalement issue de l'utilisation de combustibles fossiles (gaz, pétrole et charbon de bois), de la pollution particulaire, constituée d'agglomérats complexes de particules solides et liquides présentes dans l'atmosphère. L'origine de ces émissions peut être naturelle (éruptions volcaniques, décomposition de matières organiques, incendie de forêts) ou anthropique (industrie, transport, agriculture, chauffage résidentiel). Par ailleurs, l'effet de serre, les pluies acides, la dégradation de la couche d'ozone et les effets climatiques, qui favorisent la propagation des composés, sont également considérés comme des phénomènes polluants. Ainsi, chaque composé est généralement classé par famille selon une réglementation particulière, par rapport à des caractéristiques physico-chimiques communes ou suivant les effets qu'ils peuvent induire chez l'homme et l'animal (CITEPA 2010).

1.2. Enjeux sanitaire et environnemental

Les objectifs actuels majeurs concernant la pollution atmosphérique visent la surveillance de la qualité de l'air et des rejets de polluants dans l'atmosphère, l'évaluation des effets sur la santé et l'information du public. Les directives établies reposent sur la réduction, la limitation, voire l'interdiction de certaines émissions polluantes dans une perspective de développement durable d'amélioration de la qualité de l'air, permettant ainsi de minimiser l'impact de la pollution atmosphérique sur les différents écosystèmes et la santé des individus. Au niveau national, la loi du 30 décembre 1996 relative à l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie¹ prend en compte tous les aspects relatifs aux transports, à la santé, à l'urbanisme, à l'énergie et à l'environnement. A l'échelle européenne, le plan « Air pur pour l'Europe », inscrit dans le programme « Clean Air For Europe (CAFE) », a pour but de mettre en place une stratégie intégrée et à long terme de lutte contre la pollution atmosphérique et de prévention des risques pour la santé et l'environnement en particulier en diminuant les risques d'exposition aux particules et à l'ozone. Il pose en cela les bases de la première action annoncée dans le 6^{ème} Programme d'Action pour l'Environnement (PAE) qui établit un cadre stratégique pour la politique environnementale de la Commission européenne jusqu'en 2012.

Les nombreuses mesures atmosphériques effectuées au plan national, européen et international ont ainsi permis de réaliser des inventaires d'émissions, dans lesquels sont détaillées les caractéristiques des sources d'émissions pour des espaces de toute taille. Le principe étant que chaque activité socio-économique soit décomposée en technologies élémentaires auxquelles il est possible d'associer des facteurs d'émissions de polluants (exprimés en masse de polluant rejeté par unité d'activité). De ce fait, on peut quantifier à l'aide d'un modèle de dispersion atmosphérique la contribution de chaque activité dans la pollution de l'air d'une zone donnée tant à petite qu'à grande échelle.

De manière générale, la pollution atmosphérique a pour origine les activités industrielles (métallurgie, raffinerie, production d'énergie) et agricoles (utilisation de pesticides), l'incinération de déchets, le transport et certaines activités domestiques (chauffage au bois, cuisson des aliments, tabagisme). En particulier, les émissions issues du trafic routier, principalement celles des véhicules à

¹ Article 2 de la Loi n° 96-1236 du 30 décembre 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie (LAURE) : « constitue une pollution atmosphérique l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ».

moteur diesel, font aujourd'hui l'objet d'importantes préoccupations (PNSE 2 2009-2013). L'augmentation progressive du nombre de véhicules motorisés, contribuant à la libération quotidienne de milliers de tonnes de polluants dans l'atmosphère, constitue un réel danger pour la santé humaine (De Abrantes *et al.* 2004). Les valeurs limites d'émissions de particules (PM10), majoritairement diffusées par les gaz d'échappement, journalière ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ à ne pas dépasser plus de 35 fois par an) et annuelle (moyenne annuelle de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$) ont été plusieurs fois dépassées depuis 2005, date de mise en vigueur fixée par l'Union Européenne pour le respect de ces normes. L'INERIS a ainsi établi que la population exposée en France à des dépassements de normes de particules dans l'air représentait 15 millions de personnes en 2007, 13 millions de personnes en 2008 et près de 6 millions de personnes en 2009. Les polluants issus du trafic routier, conduisant de plus en plus fréquemment à la survenue d'épisodes critiques en matière de qualité de l'air en zone urbaine, compromettent ainsi la qualité de vie et la sécurité sanitaire d'un très grand nombre d'individus.

Les constats récents concernant les risques sanitaires liés à la pollution atmosphérique sont très alarmistes. Ces dix dernières années, l'augmentation de cas pathologiques a pu être mise en relation avec certains phénomènes polluants. En 2005 en Europe, on recensait environ 400 000 décès prématurés liés à la pollution atmosphérique. 30 000 décès précoces par an ont été recensés comme ayant un lien avec la pollution atmosphérique urbaine (Conceição *et al.* 2001). Hoek *et al.* (2002) ont également constaté une augmentation du nombre de décès au sein d'une population habitant à proximité d'une route à trafic important. Les affections mises en évidence jusqu'alors se traduisaient principalement par des troubles respiratoire et cardio-vasculaire (Bai *et al.* 2007). De plus, alors qu'il est estimé que 7 à 20 % des cas de cancers seraient favorisés par des facteurs environnementaux, les troubles de la reproduction rencontrés par près de 14 % des couples français pourraient également être causés par l'exposition à des substances reprotoxiques (PNSE 2 2009-2013). Par ailleurs, on dénombre à ce jour un million d'individus exposés à des composés cancérigènes en milieu professionnel. Pour autant, il paraît difficile de faire un lien direct entre une pathologie et une exposition particulière ou un polluant particulier. Dans la plupart des cas, la synergie des effets rend indissociables les conséquences propres à un seul composé.

Malgré la prise de conscience des dangers imminents auxquels sont exposés les individus et les conséquences pour l'environnement, les capacités d'expertises, les moyens de recherche, la formation et l'information concernant l'évaluation des risques chimiques tendent seulement à être coordonnés (REACH 2007). Si d'importants progrès sont à noter concernant des polluants classiques de l'air ambiant, notamment liés aux activités industrielles, une vigilance particulière est affichée par rapport à des éléments traces, tels que certains Polluants Organiques Persistants (POP) et les nanoparticules, pour

lesquels l'exposition et les effets via le compartiment aérien sont encore mal connus (IFEN 2006).

1.3. Les Polluants Organiques Persistants

1.3.1. Propriétés physico-chimiques

Les POP constituent un groupe de composés organiques divisé en plusieurs sous-groupes : les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD), les polychlorodibenzo-furanes (PCDF), les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE), les hexachlorobenzènes (HCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces composés possèdent un ensemble de propriétés physiques et chimiques communes, telles qu'une grande stabilité dans l'environnement qui leur permet d'être transportés sur de longues distances par le biais des phénomènes naturels (courants atmosphériques et marins) et un caractère hautement lipophile qui favorise leur bioaccumulation dans les tissus adipeux et leur transfert dans la chaîne alimentaire (**Tableau 1**). Les POP, largement rejetés dans l'environnement depuis plusieurs dizaines d'années et actuellement omniprésents dans tous les écosystèmes, représentent aujourd'hui un risque important pour l'homme situé au sommet de la chaîne alimentaire. Compte tenu de leur large diffusion et de leur potentiel toxique, la surveillance et la gestion des risques des expositions aux POP constituent une priorité.

1.3.2. Cadre réglementaire

A l'échelle internationale, les émissions de POP sont réglementées depuis une dizaine d'années par deux accords majeurs. D'une part, le protocole d'Aarhus, adopté en 1998 par les états signataires de la convention sur le transport de la pollution atmosphérique à longue distance (CEE-NU), avait pour objectif de réduire les émissions d'une classe particulière des POP, les HAP, en dessous des niveaux observés en 1990. D'autre part, le traité de Stockholm, réunissant 122 pays sous l'égide du Programme des Nations Unies en décembre 2000, préconisait l'interdiction d'usage de 12 composés extrêmement toxiques, dont certains congénères des PCB, des PCDD/F ainsi que 9 pesticides (aldrine, dieldrine, DDT, endrine, chlordane, hexachlorobenzène, mirex, toxaphène et heptachlore). Par principe de précaution, d'autres POP ont par la suite été ajoutés à cette liste. L'interdiction prononcée par la convention visait l'élimination de ces composés par l'arrêt de leur utilisation et de leur production. Chaque partie devait également s'assurer qu'aucun nouveau produit chimique, présentant des caractéristiques propres aux POP (en particulier : la persistance, la toxicité et la bioaccumulation), ne soit produit et qu'aucune installation ne génère ou n'émette des composés de ce type. Les substances bannies devaient alors être remplacées par d'autres molécules.

Tableau 1 : Liste nominative des POP (ADEME 2004) et leurs seuils de rejet dans l'air (Journal officiel de l'Union européenne 2006)

<i>Catégorie</i>	<i>Nom</i>	<i>Particularité</i>	<i>Seuil de rejet dans l'air (kg/an)</i>
Production non-intentionnelle (sous-produit de réaction)	Dioxines		0,0001 (en Teq)
	Furannes		
	Hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP)	Sous-produit de combustion ou d'autres procédés industriels	50
	<i>naphtalène</i>		100
	Hexachlorobenzène (HCB)		10
Produits chimiques industriels	Polychlorobiphényles (PCB)	Utilisés comme isolant électrique, fluide caloporteur, additif dans les peintures et plastiques	0,1
	Hexachlorocyclohexane (HCH)	Produit intermédiaire de l'industrie chimique	10
	Hexachlorobenzène (HCB)	Utilisé dans la fabrication de munitions et de caoutchouc	10
	Hexachlorobenzène (HCB)	Fongicide	
Pesticides	Endrine		1
	Aldrine		1
	Dieldrine		1
	Toxaphène		1
	Mirex	Insecticides	1
	Chlordane		1
	Chlordécone		1
	Heptachlore		1
	DDT		1
	Lindane		1

Au niveau européen, la Commission Européenne a adopté en 2005 une directive sur la qualité de l'air (directive fille 2004/107/CE de la directive cadre 96/62/CE sur l'évaluation et la gestion de l'air ambiant) concernant les HAP et certains métaux présents dans l'air. Dans le but d'améliorer la santé publique et la qualité de l'environnement, des concentrations à ne pas dépasser dans l'air ambiant avaient alors été établies pour ces composés. En particulier, un seuil de 1 ng/m³ a été fixé pour le benzo(a)pyrène (B(a)P), molécule utilisée comme traceur du risque cancérigène lié à l'ensemble des HAP. Dans le cadre du programme CAFE, la Commission Européenne étudie les valeurs limites qui pourraient être fixées dans une nouvelle norme européenne au sujet des émissions de véhicules à moteur diesel.

Au plan national, les autorités sont d'une part chargées de veiller au respect des valeurs limites établies par les instances européennes et d'autre part contraintes à mener une politique interne de surveillance et de lutte contre la pollution atmosphérique. Ainsi, en France, de nombreuses directives concernant des émissions émanant de sources spécifiques (incinérateur, chauffage domestique, gaz d'échappement, solvants, peintures) ont été prononcées et sont actuellement suivies. Diverses actions, comme la limitation de la circulation en milieu urbain en période de forte pollution, sont également ponctuellement conduites. La surveillance et le développement de stratégies locales permettent ainsi d'éviter l'émergence de situations polluantes critiques dans un espace délimité, mais ne contribuent qu'à modifier à court terme les comportements des individus. Malgré les efforts de prévention et la réglementation existante, les causes initiales du problème sont négligées. Pour tenter de résoudre les problèmes liés à la pollution atmosphérique, le gouvernement français s'est engagé, comme 52 autres pays lors de la troisième conférence ministérielle des pays de la zone Europe de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1999, à élaborer un Plan National Santé-Environnement (PNSE). Il s'agit d'un programme détaillé d'actions, dont le suivi doit permettre de limiter les émissions polluantes et par conséquent les risques sanitaires. Le 1^{er} plan (PNSE 1 2001-2004) proposait de considérer un plus grand nombre de polluants ainsi que les lieux et modes de vie des individus. En particulier, l'espace domestique, l'environnement extérieur et le milieu professionnel étaient abordés pour la première fois de façon conjointe grâce au diagnostic d'une commission d'orientation sur l'exposition quotidienne des français aux pollutions environnementales. Le PNSE 1 s'inscrivait en ce sens comme un projet novateur définissant des mesures gouvernementales pour les cinq années à venir, visant principalement à prévenir les pathologies liées aux expositions environnementales et à protéger les populations particulièrement sensibles (les enfants, les femmes enceintes et les personnes fortement exposées en milieu professionnel). Il constitue également la réponse aux engagements de Budapest en 2004 concernant l'élaboration d'un plan santé-environnement pour les enfants.

Parmi les actions définies par le programme, la réduction des émissions de particules diesel et de substances toxiques d'origine industrielle constituaient une priorité. Le plan préconisait de plus le renforcement de la réglementation en matière de qualité de l'air intérieur et l'identification des polluants présents dans les espaces clos. Le 2^{ème} plan (PNSE 2 2009-2013), davantage transversal et en interaction avec de nombreux engagements du Grenelle de l'environnement, s'inscrit dans l'ensemble des plans mis en œuvre par les pouvoirs publics pour réduire les agressions de l'homme sur son environnement ou pour le protéger de l'impact sanitaire qu'elles engendrent. Actuellement, seuls quelques milliers de substances chimiques sur environ 100 000 composés répertoriés font l'objet d'une évaluation précise des risques sanitaires qui leur sont liés. Le PNSE prévoit ainsi de progresser dans la maîtrise des risques liés aux substances chimiques et particulièrement dans les effets susceptibles d'être induits à long terme après des expositions à faibles doses.

1.3.3. Sources et situations d'émissions

L'inventaire des émissions de POP en 2008 montrait qu'ils étaient majoritairement émis par le secteur résidentiel (67,6 % pour les HAP, 20 % pour les PCB, 17 % pour les PCDD/F et 6,3 % pour les HCB ; **Figure 1**) et notamment par la combustion de la biomasse. Les gaz d'échappements automobiles, le traitement des déchets, la métallurgie, l'industrie chimique et la production d'énergie constituent après le résidentiel les principaux domaines d'émission de ces polluants. On note en particulier que les émissions de POP sont largement représentées par les émissions des HAP, lesquelles ont atteint 19 tonnes en 2008 (CITEPA 2010).

Par ailleurs, l'atmosphère est l'un des principaux canaux de transport et de dépôt des composés chimiques naturels et anthropiques, capable de les disperser sur de très longues distances (Bae *et al.* 2002). La nature et la concentration des composés libérés étant variables suivant leur proximité à la source d'émission (Papageorgopoulou *et al.* 1999), on distingue généralement les émissions polluantes suivant leur origine. Ainsi, la nature des composés émis dans les espaces clos diffèrent de ceux produits à l'extérieur du fait même de la diversité des sources d'émission. La pollution atmosphérique, communément associée à la pollution de l'air extérieur, tient également compte de la pollution intérieure reliée aux activités et aux comportements des individus (tabagisme, bricolage, traitement des plantes, aération des pièces), aux équipements (système de chauffage, de production d'eau chaude, ameublement) et aux bâtiments (matériaux de construction, revêtements muraux et revêtements de sols). Longtemps négligée par rapport à la pollution extérieure, la pollution intérieure fait aujourd'hui l'objet d'un intérêt grandissant du fait de l'augmentation du temps passé (80 % du temps quotidien) à l'intérieur des locaux (le logement, le lieu de travail, l'école, les véhicules) amenant les individus à être

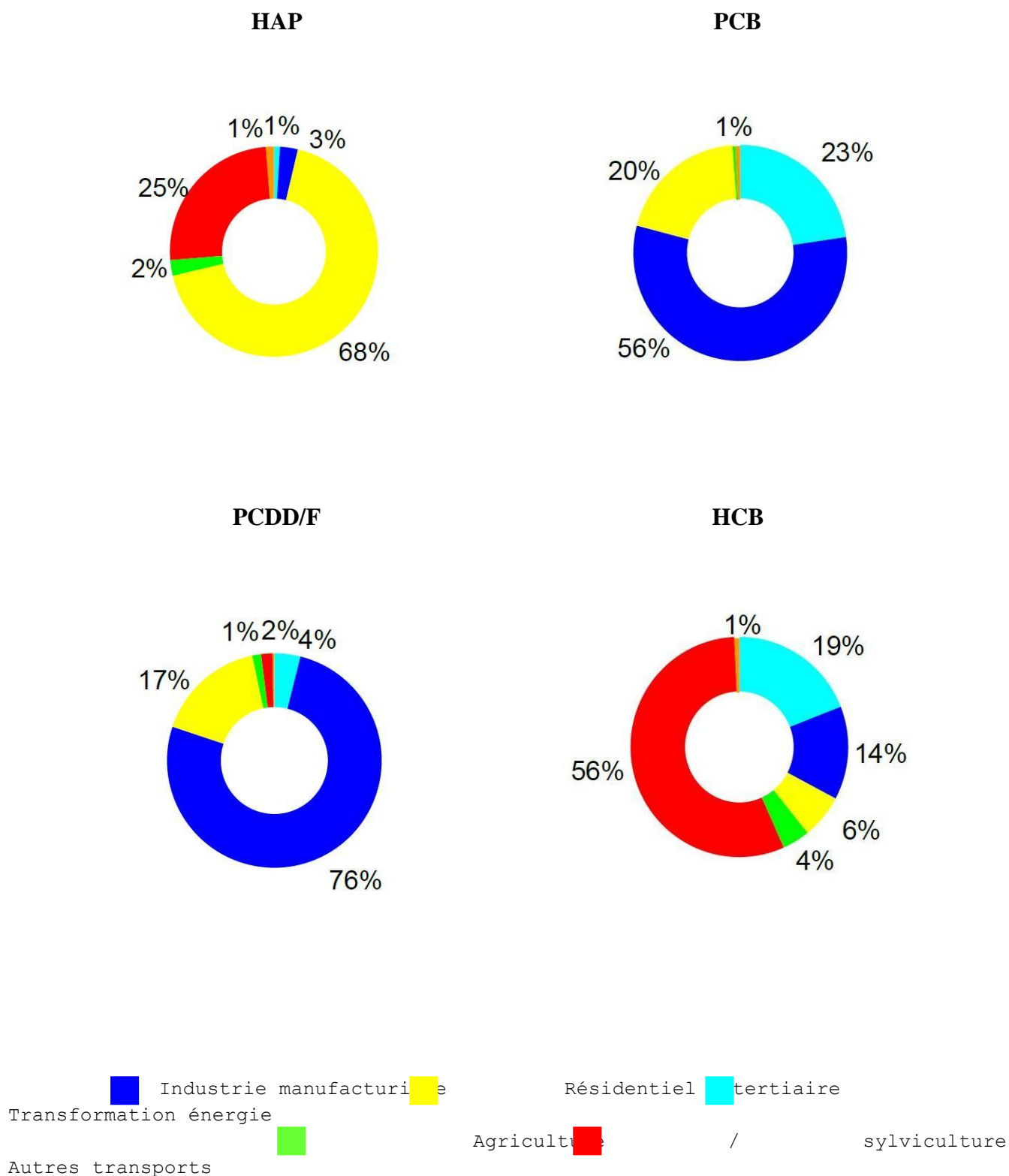


Figure 1 : Pourcentages des émissions atmosphériques des POP par secteur en France métropolitaine en 2008 (CITEPA 2010)

exposés à d'importants niveaux de contamination (ANSES 2011, Dor *et al.* 2010, Duboudin 2009). Pour la population générale, le risque individuel est relativement faible, mais pour les populations sensibles, il peut s'avérer conséquent si l'état de santé et l'intensité de l'exposition favorisent l'apparition de troubles. En milieu professionnel, les individus peuvent être exposés à de fortes concentrations de composés chimiques dont la nature et le temps d'exposition varient suivant le type de poste occupé (Vadali *et al.* 2009).

Ainsi, les niveaux d'exposition dépendent principalement du lieu de vie (zone rurale, zone urbaine ou proximité d'un site industriel), du mode de transport, des moyens de chauffage utilisés et de l'activité professionnelle. En particulier, l'importante densité de population et les émissions automobiles majoritaires en zone urbaine font des habitants des grandes villes les individus les plus exposés à la pollution atmosphérique (Caricchia *et al.* 1999).

1.4. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

1.4.1. Propriétés physico-chimiques

Cette classe de contaminants, constituée de molécules organiques formées de 2 à 7 noyaux benzéniques, regroupe environ 1 000 composés omniprésents dans l'environnement. Parmi ces composés, 26 représentent à eux seuls 90 à 95 % des émissions totales de HAP, 16 sont inclus dans la liste des 275 substances à surveiller en priorité par l'« Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) », parmi lesquels l'ensemble des HAP a été placé en 8^{ème} position en 2007 (CERCLA 2007), et un composé, le B(a)P, sert de molécule de référence du fait de son importante toxicité (IARC 1983) (**Tableau 2**).

1.4.2. Sources et situations d'émissions

Les HAP sont générés par la combustion incomplète et/ou la pyrolyse de matières fossiles au cours des éruptions volcaniques, des feux de forêt, de la combustion du charbon et du bois, des fumées d'incinérations industrielles, des fumées de bitume des revêtements routiers, des émissions automobiles, de la transformation du pétrole et de l'aluminium et sont présents dans la fumée de tabac (ATSDR 1995). Ils sont diffusés dans l'atmosphère sous forme gazeuse ou particulaire formant des mélanges complexes de plusieurs composés (Allen *et al.* 1996). Selon les sources émettrices, la nature et la concentration des HAP présents dans l'air varient (Baek *et al.* 1991). Néanmoins, de manière générale, les composés gazeux tels que le naphthalène et le fluorène prédominent dans les émissions

Tableau 2 : Liste des 16 HAP classés prioritaires par l'USEPA

Nom	Nombre de cycles	Formule chimique
Naphtalène	2	C10H8
Acénaphtylène		C12H8
Acénaphène		C12H10
Fluorène	3	C13H10
Anthracène		C14H10
Phénanthrène		C14H10
Fluoranthène		C16H10
Pyrène	4	C16H10
Benzo (a) anthracène		C18H12
Chrysène		C18H12
Benzo (a) pyrène		C20H12
Benzo (b) fluoranthène	5	C20H12
Dibenzo (ah) anthracène		C22H14
Benzo (k) fluoranthène		C20H12
Benzo (ghi) pérylène	6	C20H12
Indeno (1,2,3-cd) pyrène		C22H12

(Gmeiner *et al.* 1997, Allen *et al.* 1996). Les émissions de HAP proviennent principalement de deux secteurs : le résidentiel/tertiaire (67,6 %) où ils sont produits dans d'importantes proportions lors de la combustion de la biomasse, souvent effectuée dans des conditions mal maîtrisées (par exemple en foyer ouvert en milieu domestique) et le transport routier (25,1 %) dont une large part est imputable aux véhicules à moteur diesel (CITEPA 2010). Les HAP gazeux sont majoritairement présents en période estivale où leurs concentrations sont fortement corrélées aux émissions automobiles (Alsberg *et al.* 1989). A l'inverse, les composés présents sous forme particulaire sont principalement émis en période hivernale (Bae *et al.* 2002), du fait d'un plus grand nombre de sources émettrices (De Nicola *et al.* 2005) et de conditions atmosphériques plus stables impliquant des phénomènes de dégradation moindres (Park *et al.* 2002, Menichini 1992) (**Tableau 3**). Malgré une réduction de 52 % des émissions de HAP sur la période 1990 – 2008² (CITEPA 2010) conforme aux objectifs fixés par le protocole d'Aarhus, aucune évolution significative n'est attendue au cours des prochaines années, du fait de la croissance permanente du trafic routier et de l'augmentation du nombre de véhicules à moteur diesel dans le parc automobile, ainsi que de la difficulté de maîtrise des émissions en HAP issus de multiples sources.

1.4.3. Voies d'entrées de la contamination

Les HAP, comme l'ensemble des POP, sont susceptibles d'être transportés sur de longues distances loin de leur lieu d'émission, peuvent contaminer le sol, la végétation et l'eau (Nadal *et al.* 2004, Lerario *et al.* 2003, Pavoni *et al.* 1998) et ainsi être transférés vers des matrices alimentaires (lait, viande, œuf, chair de poisson) (Tao *et al.* 2004, Grova *et al.* 2002, Lodovici *et al.* 1995). Leur fort potentiel de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire et leur action toxique rémanente contribue de surcroît à augmenter les risques potentiels pour l'homme. On distingue plusieurs cas d'expositions possibles aux HAP : l'ingestion d'aliments grillés ou fumés, l'ingestion accidentelle de sol contaminé, l'inhalation d'air pollué principalement par les gaz d'échappement automobiles et la fumée de cigarette (Liu *et al.* 2007, Tsapakis et Stephanou 2005, Cincinelli *et al.* 2004) et l'absorption cutanée par contact avec des matériaux contenant des HAP (créosote, goudron de houille). Pour la population générale, l'ingestion et l'inhalation constituent les deux voies d'entrées majeures de la contamination (Ramesh *et al.* 2004, Boström *et al.* 2002, ATSDR 1995), alors que dans le cadre de certaines activités professionnelles les intoxications par inhalation et par voie cutanée prédominent (Marczynski *et al.*

² La diminution observée était essentiellement due à une baisse de la consommation des combustibles (principalement le bois) et un renouvellement des équipements dans le secteur résidentiel.

Tableau 3 : Concentrations atmosphériques en HAP mesurées en différents lieux dans le monde

Lieux			Année d'étude	Composés	Concentrations	Référence
Amérique du nord						
Etats-Unis	Chicago	zone urbaine, été	1995	Σ14 HAP	428 ng/m ³	Odabasi <i>et al.</i> 1999
		zone urbaine, hiver	1988	Σ13 HAP	442 ng/m ³	Cotham et Bidleman 1995
		zone industrielle	1994 - 5	Σ19 HAP	22 ng/m ³	Simcik <i>et al.</i> 1997
	Boston	zone urbaine	1994	Σ23 HAP	49,73 ng/m ³	Allen <i>et al.</i> 1996
		zone rurale	1994	Σ11 HAP	1,184 ng/m ³	Allen <i>et al.</i> 1996
	Houston	zone urbaine, été			119 ng/m ³	Lewis <i>et al.</i> 1991
	Denver	zone urbaine, été		Σ13 HAP	93 ng/m ³	Forearm et Bidleman 1990
Columbia	zone urbaine		Σ13 HAP	56 ng/m ³	Keller et Bidleman 1984	
Canada	Montréal	trafic routier		Σ12 HAP	62,7 ng/m ³	Ringuette <i>et al.</i> 1993
Amérique du sud						
Argentine	La Plata	zone industrielle	1999 - 2002	Σ15 HAP	7,26 ng/m ³	Rehwagen <i>et al.</i> 2005
		zone urbaine	1999 - 2002	Σ15 HAP	4,742 ng/m ³	Rehwagen <i>et al.</i> 2005
Mexique	3 sites à Tabasco		2007 - 8	Σ16 HAP	302,4 ng/m ³	Gamboa <i>et al.</i> 2008
Europe						
France	Strasbourg	zone urbaine	2006 - 7	Σ HAP (PM ₁₀)	12,6 ng/m ³	Delhomme et Millet 2011
Allemagne	Leipzig	zone urbaine	1999 - 2002	Σ15 HAP	2,079 ng/m ³	Rehwagen <i>et al.</i> 2005
Belgique	Flandres	zone urbaine	2000 - 1	Σ16 HAP (PM ₁₀)	93,025 ng/m ³	Rockens <i>et al.</i> 2000
		zone industrielle	2000 - 1	Σ16 HAP (PM ₁₀)	55,125 ng/m ³	Rockens <i>et al.</i> 2000
Angleterre	Londres	zone urbaine	1991	Σ15 HAP	166 ng/m ³	Halsall <i>et al.</i> 1994
Italie	Naples	trafic routier	1996 - 7	Σ15 HAP (PM ₁₀)	54,8 ng/m ³	Caricchia <i>et al.</i> 1999
		zone industrielle	1996 - 7	Σ15 HAP (PM ₁₀)	39,5 ng/m ³	Caricchia <i>et al.</i> 1999
		zone urbaine	1996 - 7	Σ15 HAP (PM ₁₀)	22,7 ng/m ³	Caricchia <i>et al.</i> 1999
Grèce	Athènes	zone urbaine	2000	Σ20 HAP	31 ng/m ³	Mandalakis <i>et al.</i> 2002
	Heraklion	zone urbaine	2000 - 2	Σ24 HAP	44,3 - 129,2 ng/m ³	Tsapakis et Stephanou 2005
Turquie	Bursa	zone urbaine	2004 - 5	Σ15 HAP	231 ng/m ³	Vardar <i>et al.</i> 2008
Suède	Stockholm	zone urbaine	2002	Σ14 HAP	100 - 200 ng/m ³	Boström <i>et al.</i> 2002

<i>Lieux</i>			<i>Année d'étude</i>	<i>Composés</i>	<i>Concentrations</i>	<i>Référence</i>
Asie						
Inde	Mumbai	<i>zone urbaine</i>	1995	Σ18 HAP (PM ₁₀)	24,5 ng/m ³	Kulkarni et Venkataraman 2000
		<i>zone industrielle</i>	1995	Σ18 HAP (PM ₁₀)	38,8 ng/m ³	Kulkarni et Venkataraman 2000
Chine	Beijing	<i>zone urbaine</i>	2007 - 8	Σ16 HAP	131 - 979,3 ng/m ³	Wang <i>et al.</i> 2011
	Hong Kong	<i>zone urbaine</i>	1999 - 2000	Σ18 HAP	89,9 - 1083,3 ng/m ³	Lee <i>et al.</i> 2001
		<i>trafic routier</i>	2000 - 1	Σ16 HAP (PM ₁₀)	44,54 ng/m ³	Guo <i>et al.</i> 2003
		<i>zone industrielle</i>	2000 - 1	Σ16 HAP (PM ₁₀)	23,86 ng/m ³	Guo <i>et al.</i> 2003
	Singapour	<i>zone urbaine</i>	2006	Σ16 HAP	22,1 - 44,6 ng/m ³	He et Balasubramanian 2009
	Donghe	<i>zone rurale</i>	2007 - 8	Σ16 HAP	303,9 - 1616,5 ng/m ³	Wang <i>et al.</i> 2011
	Guanzhou	<i>zone urbaine</i>	2001	Σ16 HAP	134,4 - 298,5 ng/m ³	Bi <i>et al.</i> 2003
	46 sites au nord	<i>zone rurale</i>	2005 - 6	Σ15 HAP	514 ng/m ³	Liu <i>et al.</i> 2007
<i>zone urbaine</i>		2005 - 6	Σ15 HAP	610 ng/m ³	Liu <i>et al.</i> 2007	
Taiwan	Tainan	<i>usine pétrochimique</i>	1994 - 5	Σ21 HAP (PM ₁₀)	116,8 ng/m ³	Sheu et Lee 1997
		<i>zone urbaine</i>	1994 - 5	Σ21 HAP (PM ₁₀)	203,9 ng/m ³	Sheu et Lee 1997
		<i>trafic routier</i>	1994 - 5	Σ21 HAP (PM ₁₀)	912 ng/m ³	Sheu et Lee 1997
	Taichung	<i>site agricole</i>	2001 - 2	Σ21 HAP (PM _{2,5})	180,62 ng/m ³	Fang <i>et al.</i> 2005
		<i>site agricole</i>	2001 - 2	Σ21 HAP (PM ₁₀)	164,98 ng/m ³	Fang <i>et al.</i> 2005
		<i>zone portuaire</i>	2004 - 5	Σ21 HAP (PM ₁₀)	76,59 ng/m ³	Fang <i>et al.</i> 2006
	12 sites au sud	<i>usines de combustion d'acier et de fer</i>		Σ21 HAP	1 020 µg/m ³	Yang <i>et al.</i> 2002
	Corée du sud	Séoul	<i>zone urbaine</i>	2000	Σ15 HAP	22,9 - 410 ng/m ³
Malaisie	Kuala Lumpur	<i>zone urbaine</i>	1998 - 9	Σ17 HAP (PM ₁₀)	6,3 ng/m ³	Omar <i>et al.</i> 2002
		<i>zone rurale</i>	2000	Σ17 HAP (PM ₁₀)	0,3 ng/m ³	Omar <i>et al.</i> 2002

2009, ATSDR 1995) (**Tableau 4**).

1.4.4. Caractéristiques du métabolisme

L'exposition des individus aux HAP conduit à l'accumulation des composés au sein de l'organisme pouvant aboutir à d'importants niveaux de contamination sur une courte période (ATSDR 1995). Au sein de l'organisme, ils subissent alors un ensemble de processus de biotransformations. Au cours de la phase I du métabolisme, ils sont oxydés par les cytochromes P450 pour former des composés époxydes réactifs, eux-mêmes réduits par l'époxyde hydrolase en métabolites hydroxylés. Certaines molécules mères sont directement hydroxylées sans formation intermédiaire d'époxydes. En phase II du métabolisme, les métabolites hydroxylés sont conjugués pour faciliter leur détoxification et leur excrétion (Grover 1986, Pelkonen et Nebert 1982). Généralement, les métabolites de faible poids moléculaire (2 à 3 cycles) sont éliminés dans les urines et les composés les plus lourds (plus de 4 cycles) sont excrétés dans les fèces (Ramesh *et al.* 2004). Ainsi, les HAP sont principalement métabolisés chez l'homme sous forme de composés oxygénés, tels que les phénols, les dihydrodiols et des substances encore plus oxydées (Gmeiner *et al.* 2002). L'analyse des concentrations des molécules mères et de leurs métabolites dans différents compartiments de l'organisme permet ainsi d'évaluer les niveaux d'exposition des individus.

1.4.5. Toxicologie

Compte tenu de l'ubiquité des HAP dans l'environnement, cette famille a généré au cours des 30 dernières années un intérêt scientifique majeur d'un point de vue toxicologique (IARC 2010, Armstrong *et al.* 2004, ATSDR 1995). De nombreuses études menées chez l'homme et l'animal ont ainsi principalement montré que les composés de type HAP, notamment ceux formés de plus de 4 cycles benzéniques, possèdent des propriétés mutagènes, cancérigènes et reprotoxiques (Samanta *et al.* 2002, Caricchia *et al.* 1999, ATSDR 1995, IARC 1987, USEPA 1984).

Seules quelques études se sont attachées à l'évaluation des effets de l'exposition aiguë aux HAP. Les DL₅₀ établies au cours de ces travaux indiquent une toxicité modérée à faible pour des expositions aiguës aux HAP. De plus, la toxicité de l'exposition répétée à des composés de type HAP (de 90 jours à 13 semaines) testée par voie orale chez le rongeur a principalement montré des atteintes hépatiques (acénaphthène, B(a)P, fluoranthène, fluorène, naphtalène) et rénales (fluoranthène, naphtalène, pyrène), ainsi qu'une perte de poids chez les animaux traités (naphtalène) (USEPA 1989a, b, c, 1988).

Tableau 4 : Estimations des quantités maximales de HAP inhalées ($\mu\text{g}/\text{j}/\text{ personne}$)

<i>Composés</i>	Pays-Bas ^a	Japon ^b	Allemagne ^c
anthracène	0.005	0.001	
anthanthrène	0.015		
benz(a)anthracène	0.030	0.013	
benzo(a)pyrène	0.025	0.017	
<i>zone rurale</i>			0.01 - 0.03
<i>zone industrielle</i>			0.02 - 0.12
<i>à proximité de la source</i>			0.06 - 1.00
benzo(b)fluoranthène	0.060	0.029	
benzo(b)fluorène	0.002	0.002	
benzo(e)pyrène	0.035	0.022	
benzo(ghi)pérylène	0.030	0.027	
benzo(j)fluoranthène	0.010		
benzo(k)fluoranthène	0.015	0.015	
chrysène	0.035		
coronene	0.025		
dibenz(a,h)anthracène	0.020	0.004	
fluoranthène	0.040	0.016	
fluorène		0.0005	
indeno(1,2,3-cd)pyrène	0.030	0.024	
pérylène	0.015	0.003	
phénanthrène	0.200	0.007	
pyrène	0.040	0.017	

^a Guicherit et Schulting 1985

^b Matsumoto et Kashimoto 1985

^c State Community of Air Pollution Control 1992

Par ailleurs, les risques d'expositions aux HAP sont le plus souvent décrits par rapport à leur potentiel cancérigène, du fait que de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* d'exposition à des HAP ou à des émissions contenant des composés de type HAP aient montré des effets cancérigène, génotoxique et mutagène (USEPA 1984a, b, OMS-IPCS 1998, ATSDR 1994, IARC 1989, 1983, 1973). Le potentiel cancérigène de ces composés a d'ailleurs majoritairement été étudié après exposition par voie cutanée, sous-cutanée ou par inhalation (OMS-IPCS 1998). En particulier, seuls les effets carcinogènes du B(a)P inhalé ont été évalués et ont montré l'induction de tumeurs au niveau du tractus respiratoire chez l'animal (Pauluhn *et al.* 1985, Thyssen *et al.* 1981). De plus, l'administration par instillation de différents composés de type HAP dans le tractus respiratoire chez le rongeur a révélé une cancérogénèse pulmonaire (OMS-IPCS 1998). D'autre part, l'administration par voie orale de certains HAP a principalement révélé l'apparition de tumeurs au niveau du tractus gastrointestinal, du foie, des poumons et des glandes mammaires chez le rongeur (Culp *et al.* 1998, OMS-IPCS 1998, ATSDR 1994, IARC 1983, 1973).

De plus, l'étude de certains composés de type HAP administrés par voies intrapéritonéale ou sous-cutanée, a montré l'induction de tumeurs hépatiques et pulmonaires chez le jeune animal (OMS-IPCS 1998, ATSDR 1994, Platt *et al.* 1990, Busby *et al.* 1988, Lavoie *et al.* 1987, IARC 1973).

Selon certains auteurs, la toxicité des HAP serait consécutive à une activation métabolique d'éléments capables de se lier à l'ADN, l'ARN ou des protéines (Gurtoo *et al.* 1983).

L'évaluation des effets de l'exposition par différentes voies des composés seuls a ainsi permis d'établir une classification des HAP selon leur potentiel cancérigène (OMS-IPCS 1998). Par ailleurs, des effets neurotoxiques ont également été mis en évidence expérimentalement chez l'animal et à travers les résultats d'études épidémiologiques chez l'homme (**Tableaux 5, 6, 7 et 8**).

Tableau 5 : Résumé des études des effets d'expositions périnatales aux HAP réalisées chez l'animal

<i>Composé</i>	<i>Animaux</i>	<i>Voie d'exposition</i>	<i>Durée et période d'exposition</i>	<i>Doses / Concentrations</i>	<i>Effets</i>	<i>Référence</i>	
<i>Période périnatale</i>							
B(a)P	rates	inhalation	subaigüe 4h/j/10j	GD11 - 20	25, 75 et 100 µg/m ³	. ↓ du taux de natalité . présence de métabolites au niveau cortical . sous-régulation du récepteur AhR durant le 1 ^{er} mois de vie postnatale	Archibong <i>et al.</i> 2002, Wu <i>et al.</i> 2003
B(a)P	rates	inhalation	subaigüe 4h/j	GD11 - 21	100 µg/m ³	. ↓ des capacités de potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe . altération des capacités d'apprentissage à PN100	Wormley <i>et al.</i> 2004
B(a)P	rates	inhalation	aigüe 4h	GD15 - 21	100 µg/m ³	. perturbation de l'expression du facteur de transcription Sp1 au cours des stades précoces	Hood <i>et al.</i> 2000
B(a)P	rates	orale	subaigüe	GD14 - 17	25 et 150 mg/kg	. sous-régulation de sous-unités du récepteur NMDA dans l'hippocampe . concentrations maximales de métabolites après 2j	Brown <i>et al.</i> 2007
B(a)P	rates	orale	subaigüe	GD14 - 17	300 µg/kg	. métabolites dans le plasma et le cerveau des jeunes avant le sevrage . ↓ de l'expression cérébrale de l'ARNm du récepteur NMDA chez les jeunes de PN100 à 120	McCallister <i>et al.</i> 2008
B(a)P	rates	orale	subaigüe	GD0 - 13	2 et 20 mg/kg	. perturbation du développement locomoteur . ↗ masse musculaire . ↓ du niveau d'anxiété à PN32 et 40	Bouayed <i>et al.</i> 2009a
B(a)P	rates	orale	subaigüe	GD14 - 17	150, 300 et 600 µg/kg	. troubles comportementaux chez les jeunes . modifications de l'expression du gène MET . concentrations maximales de métabolites au cours du processus de synaptogénèse	Sheng <i>et al.</i> 2010

Tableau 6 : Résumé des études des effets d'expositions aux HAP réalisées
chez l'animal adulte

<i>Composé</i>	<i>Animaux</i>	<i>Voie d'exposition</i>	<i>Durée et période d'exposition</i>	<i>Doses / Concentrations</i>	<i>Effets</i>	<i>Référence</i>
Age adulte						
B(a)P	rats ♂	orale	aiguë	25, 50, 100 et 200 mg/kg	. troubles comportementaux induits par l'intermédiaire de mécanismes du stress oxydatif . inhibition de l'activité de certaines enzymes	Saunders <i>et al.</i> 2006
B(a)P	rats ♂	orale	aiguë	25, 50, 100 et 200 mg/kg	. concentrations maximales de métabolites après 6h . effets neurotoxiques après 2h, réversibles après 48h	Saunders <i>et al.</i> 2002
B(a)P	rats ♂	orale	aiguë	12,5, 25, 50, 100 et 200 mg/kg	. altération des fonctions neuromusculaires et sensorimotrices après 2 et 4h, réversibles après 72h . atteintes majeures observées chez les ♂	Saunders <i>et al.</i> 2001
B(a)P	souris ♂	orale	subaiguë 28j	0,02 et 0,2 mg/kg	. altérations comportementale relatives à l'agressivité et au comportement sexuel	Bouayed <i>et al.</i> 2009b
fluoranthène	rats ♂/♀	orale	aiguë	1000, 2000 et 3000 mg/kg	. altération de la fonction rénale plus importante chez les ♂	Knuckles <i>et al.</i> 2004
fluoranthène	rats ♂/♀	orale	aiguë	100, 200 et 400 mg/kg	. déficits neurologiques 6h après le traitement, réversibles après 48h . atteintes + importantes chez les ♀	Saunders <i>et al.</i> 2003
B(a)P	rats ♂	inhalation	aiguë 4h	0,1, 1 et 2,5 ng/m ³	. concentrations maximum de B(a)P et de métabolites 1h après l'exposition . faibles concentrations de B(a)P dans le plasma et de métabolites au niveau des poumons 4h après l'exposition	Ramesh <i>et al.</i> 2001
B(a)P	rates ♀	i.p.	subaiguë 10j	0,02, 0,2, 2, 20 et 200 mg/kg	. 0,02 et 0,2 mg/kg: altération de l'apprentissage et de la mémoire à court terme . modification de l'expression des sous-unités NR1, 2A et 2B du récepteur NMDA dans l'hippocampe, l'hypothalamus, le cervelet et le cortex temporal . présence de B(a)P et de métabolites dans le sang et le cerveau . ↘ du niveau d'anxiété	Grova <i>et al.</i> 2007, 2008
B(a)P	rats ♂	i.p.	subaiguë 3j	10 mg/kg	. ↗ activité dopaminergique dans l'hippocampe et inhibition dans le putamen	Konstandi <i>et al.</i> 2007
B(a)P	rates ♀	i.p.	subaiguë 1 ou 2 injections/semaine	50 mg/kg	. altérations des systèmes dopaminergique et sérotoninergique au niveau cérébral	Stéphanou <i>et al.</i> 1998
3-méthylchloranthène	rats ♂	i.p.	subaiguë 2 injections/semaine/1 mois	25 mg/kg	. ↘ des capacités d'apprentissage	Konstandi <i>et al.</i> 1997

Tableau 7 : Résumé des études épidémiologiques des effets d'expositions aux HAP réalisées chez l'enfant

<i>Lieu</i>	<i>Individu</i>	<i>Composés</i>	<i>Effets</i>	<i>Référence</i>
Enfants				
Pologne	Femmes	HAP environnementaux <i>benzo(b)fluoranthène: 23 ng/m³</i> <i>benzo(a)anthracène: 16 ng/m³</i> <i>IP: 14 ng/m³</i> <i>B(a)P: 12 ng/m³</i>	. troubles du comportement neurocognitif chez les enfants	Jedrychowski <i>et al.</i> 2003
Pologne	Femmes	HAP environnementaux <i>B(a)P: 7 à 15 ng/m³</i>	. ↓ de la circonférence de la tête des enfants à la naissance	Perera <i>et al.</i> 1998
Etats-Unis, New York	Femmes afro-américaines et dominicaines	8 HAP <i>0,36 à 36,47 ng/m³</i> <i>0,65 à 36,47 ng/m³</i> <i>2,26 ng/m³</i>	. ↓ de la circonférence de la tête des enfants à la naissance . enfants à 3 ans: index de développement mental + faible . enfants à 5 ans: score + faible au test de QI . ↑ du taux d'adduits dans le sang du cordon . enfants de 5 ans: ↑ de l'anxiété et de la dépression . enfants de 5 et 7 ans: déficits attentionnels	Perera <i>et al.</i> 2003 Perera <i>et al.</i> 2006 Perera <i>et al.</i> 2009 Perera <i>et al.</i> 2011
République Tchèque	Femmes	HAP environnementaux	. altération des capacités d'apprentissage	Otto <i>et al.</i> 1997
France, Italie, Espagne	Hommes	HAP environnementaux	. ↑ du risque de tumeur neuroectodermal chez l'enfant	Cordier <i>et al.</i> 1997
Etats-Unis	Hommes et femmes	créosote	. ↑ du risque de neuroblastome chez l'enfant	Kerr <i>et al.</i> 2000
Chine	Femmes	HAP environnementaux <i>proximité de centrale électrique</i>	. enfants à 2 ans: retards développementaux	Tang <i>et al.</i> 2008

Tableau 8 : Résumé des études épidémiologiques des effets d'expositions aux HAP réalisées chez l'adulte

<i>Lieu</i>	<i>Individu</i>	<i>Composés</i>	<i>Effets</i>	<i>Référence</i>
Adultes				
Pologne	Ouvriers <i>usine de fuel</i>	HAP milieu professionnel	. symptômes neurologiques . atteintes de la mémoire à court terme . ↗ des effets avec le niveau d'exposition au B(a)P	Majchrzak <i>et al.</i> 1990
Etats-Unis, Texas	Habitants <i>site de retraitement de déchets chimiques</i>	B(a)P, benz(a)anthracène, chrysène, naphthalène, fluorène, pyrène	. symptômes neurologiques: perturbations des capacités d'apprentissage, du sommeil, tremblements, fatigue inhabituelle, modification du goût et de l'odorat, nervosité, engourdissements	Dayal <i>et al.</i> 1995
Etats-Unis, Louisiane	Habitants <i>site de retraitement d'huile de moteurs et de déchets chimiques</i>	HAP issus des émissions industrielles	. atteintes neurophysiologiques et neuropsychologiques (dépression, confusion, fatigue)	Kilburn et Warshaw 1995
Etats-Unis, Mississippi	Habitants <i>site de production de créosote</i>	HAP issus des émissions industrielles	. atteintes neurophysiologiques	Dahlgren <i>et al.</i> 2003
Chine	Ouvriers <i>four à charbon</i>	B(a)P	. ↘ des capacités d'apprentissage et de perception . ↗ de la concentration en 1OH-pyrène dans les urines	Niu <i>et al.</i> 2010, Nie <i>et al.</i> 2008

1.5. Le fluorène

1.5.1. Critères de choix

Dans le but d'étudier les effets de l'exposition aux HAP présents dans l'air ambiant sur les performances cognitives des individus, plusieurs expérimentations ont été réalisées chez l'animal. En accord avec nos collaborateurs du département « Polluants et Santé » de l'INRS de Vandoeuvre-lès-Nancy (54), un composé de cette famille a été choisi pour modéliser l'exposition globale aux HAP, le fluorène. Plusieurs critères légitiment ce choix : 1) listé parmi les 16 HAP prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé et l'USEPA, le fluorène s'inscrit comme une molécule particulièrement préoccupante pour la santé humaine ; 2) parmi les 16 HAP prioritaires, il est le 2^{ème} composé volatil majoritairement présent dans l'air ambiant, après le naphthalène, avec une concentration généralement supérieure à 1 ng/m³ et pouvant atteindre 5 ng/m³ (**Tableau 9**) (Ramirez *et al.* 2011, IARC 2010, Li *et al.* 2010, INERIS 2005) ; 3) il est utilisé en milieu industriel en tant qu'intermédiaire dans la fabrication de certains produits et médicaments (INERIS 2005), contaminant ainsi potentiellement les individus qui le manipulent ; 4) des concentrations non négligeables de fluorène ont été dosées dans le lait maternel (Zanieri *et al.* 2007, Del Bubba *et al.* 2005), posant ainsi la question de l'intoxication du nourrisson et de ses effets sur le développement.

1.5.2. Caractéristiques physico-chimiques

La molécule de fluorène est composée de deux cycles aromatiques. Elle est relativement peu soluble dans l'eau (1 685 à 1 980 µg/L à 25°C) et se compose d'un nombre impair d'atomes de carbones (C₁₃H₁₀), la rendant particulièrement stable dans les solutions aqueuses comparé aux autres HAP (Kot-Wasik 2004). La biodisponibilité relative des composés au sein de l'organisme étant dépendante entre autre de leur solubilité dans l'eau, le fluorène sera moins facilement métabolisé au profit d'autres HAP au nombre de cycles plus élevé. De fait il est plus longtemps présent dans l'organisme sous forme native, ce qui peut favoriser sa toxicité. Peu de données concernant son métabolisme sont disponibles, la plupart des études traitant de sa dégradation par des bactéries dans des sols contaminés. Néanmoins, des métabolites oxygénés, des phénols et des cétones ont été identifiés dans des particules atmosphériques (Tomingas *et al.* 1986) et des métabolites monohydroxylés du fluorène ont été dosés dans l'urine d'individus exposés aux HAP en milieu professionnel (1-, 2-, 4-, et 9-OH fluorène dans l'étude de Gmeiner *et al.* 2002 ; 2-, 3-, et 9-OH fluorène dans l'étude de Li *et al.* 2008).

Tableau 9 : Concentrations atmosphériques des 16 HAP listés par l'USEPA (INERIS 2005)

Composé	Concentration dans l'air
Naphtalène	< 1 µg/m ³
Fluorène	< 5 ng/m ³
Fluoranthène	1 ng/m ³
Pyrène	< 1 ng/m ³
Dibenz(a,h)anthracène	< 0,5 ng/m ³
Benzo(b)fluoranthène	0,1 - 1 ng/m ³
Benzo(k)fluoranthène	0,1 - 1 ng/m ³
Benzo(ghi)pérylène	0,01 - 1 ng/m ³
Anthracène	< 0,1 ng/m ³
Phénanthrène	< 0,1 ng/m ³
Chrysène	10 - 100 pg/m ³
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	< 50 pg/m ³
Benzo(a)pyrène	< 10 pg/m ³
Acénaphthylène	-
Acénaphène	-
Benz(a)anthracène	-

1.5.3. Sources d'exposition et utilisations

Comme l'ensemble des HAP, le fluorène est produit lors de la combustion incomplète de combustibles fossiles. Des mesures atmosphériques ont révélé que les gaz d'échappement automobiles libèrent de 4,3 à 7,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de fluorène pour les véhicules à moteur essence et de 2,7 à 4,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ pour les véhicules à moteur diesel (HSDB 2001, Jensen et Hites 1983). Au niveau industriel, les raffineries de pétrole françaises émettent de l'ordre de 2,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de fluorène (OMS-IPCS 1998). De plus, le fluorène représente 17% de l'émission en HAP dans la fumée de tabac, constituant ainsi le 2^{ème} HAP majoritairement présent dans ces émissions après le naphthalène (Gmeiner *et al.* 2002, 1997). En particulier, l'inhalation de la fumée de tabac s'avère être une des sources d'exposition majeures au fluorène à l'échelle individuelle (Wynder *et al.* 1967).

Par ailleurs, le fluorène est manipulé dans divers milieux professionnels : il est un intermédiaire chimique utilisé notamment dans la formation de radicaux polyfonctionnels catalyseurs, dans la fabrication de résines et dans la production de teintures (INERIS 2005). Il est également employé comme synthon de départ dans l'élaboration de médicaments antidiabétiques et antiarythmiques (INERIS 2005), et est largement diffusé dans l'air par la fumée de bitume lors de la construction des routes (Gmeiner *et al.* 2002).

1.5.4. Toxicologie

L'étude de l'exposition au fluorène par voie orale a principalement révélé des atteintes hépatiques, telles qu'une augmentation du poids du foie chez des rats ayant reçu une dose unique de 150 mg/kg du composé (Danz *et al.* 1991, Danz et Brauer 1988), ainsi que chez des rats partiellement hepactomisés ayant été traités pendant 10 jours à 180 mg/kg/j de fluorène (Gershbein 1975).

L'administration chronique du composé a par ailleurs induit chez des rats traités à 62 mg ou 1 g/kg/j de fluorène pendant 104 jours une perte de poids significative (Wilson *et al.* 1946). De plus, des souris traitées pendant 13 semaines à 125, 250 ou 500 mg/kg/j de fluorène ont montré des modifications histopathologiques, des signes d'hypoactivité, une diminution du poids du foie et de la rate, ainsi qu'une diminution du nombre d'érythrocytes et de la concentration en hémoglobine (USEPA 1989). Aucun trouble du système respiratoire, cardiovasculaire, gastro-intestinal et reproducteur n'avait par contre été observé chez les animaux traités. Compte tenu des résultats de cette étude, des valeurs limites ont été établies pour des atteintes hématologiques : LOAEL = 250 mg/kg/j, NOAEL = 125 mg/kg/j. L'étude de Morris *et al.* (1960) a également montré d'une part que des rates traitées à 12,3

mg/kg/j de fluorène durant 6 mois développaient des troubles gastriques et hépatiques (cirrhose), ainsi que des lésions au niveau de l'utérus et de l'intestin grêle (ulcérations de l'épithélium), et d'autre part, que l'ingestion de 13,1 mg/kg/j de fluorène pendant 18 mois provoquait des troubles respiratoires (hyperplasies de la muqueuse nasale) 6 mois après le début du traitement, qui ne persistent pas après 18 mois d'ingestion de fluorène.

Par ailleurs, l'administration par voie orale d'une dose moyenne de 796 mg de fluorène durant 10 mois a induit chez la rate l'apparition de carcinomes au niveau des reins et de l'uretère (Morris *et al.* 1960). Une autre étude a montré que l'ingestion de 125, 250 ou 500 mg/kg de fluorène pendant 453 jours provoquait chez le rat des adénomes au niveau rénal (Wilson *et al.* 1946). Néanmoins, il n'est pas défini comme un composé cancérigène pour l'homme (Lee *et al.* 1991, IARC 1983).

Sur la base des études citées, un niveau de risque minimum (*MRL - Minimum Risk Level*) concernant l'exposition subchronique au fluorène par voie orale de 0,4 mg/kg/j (ATSDR 1995), ainsi qu'une dose de référence (*RfD - Reference Dose*) pour une exposition chronique par voie orale de 0,04 mg/kg/j (USEPA 1990) ont été établies.

II. Définition de la problématique de l'étude

II.1. Populations à risque

II.1.1. Individus en développement

II.1.1.1. Sensibilité particulière

Depuis les dix dernières années, la législation et les programmes de recherche portent une attention particulière aux effets des contaminants environnementaux sur le devenir du fœtus, du nouveau-né et de l'enfant (Goldman et Koduru 2000). Une étude menée par l'« Environmental Working Group » en 2005 sur la contamination du fœtus a montré la présence de 287 substances chimiques, pesticides et autres polluants dans le sang du cordon ombilical dans un échantillon de 10 enfants, prouvant qu'*in utero*, le fœtus est exposé à un très grand nombre de composés susceptibles d'altérer son développement. Dans le cadre du PNSE 1, le suivi de 20 000 enfants, depuis la grossesse jusqu'à l'âge

adulte, devait permettre de recueillir des informations sur l'apparition de pathologies cancéreuses, reprotoxiques et neurotoxiques en lien avec l'environnement. L'exposition de la mère était en parallèle analysée à travers différentes caractéristiques : mode de vie avant la conception et pendant la grossesse, lieu de vie, activités extérieures et conditions de travail. Cette étude avait pour but d'identifier le lien existant entre la pollution atmosphérique et certains effets délétères observés à la naissance, tels qu'une diminution du poids des nouveaux nés et une augmentation des naissances prématurées (Hill et Keating 2002) et ainsi d'établir des priorités d'actions vis-à-vis de certaines substances.

Par ailleurs, en phase précoce de développement, l'exposition à des composés toxiques peut avoir des effets plus délétères sur l'organisme comparé à l'âge adulte du fait que :

- le fœtus et le nouveau-né, exclusivement nourris par l'organisme maternel au cours de la grossesse et de l'allaitement, sont indirectement exposés par leur mère, elle-même contaminée par la chaîne alimentaire sous-jacente et par la pollution atmosphérique, et donc vecteur de l'intoxication vis-à-vis de l'enfant,
- les organes en développement étant plus sensibles par leur immaturité (Perera *et al.* 2004, Andersen *et al.* 2000, Dencker et Eriksson 1998), une intoxication prénatale peut affecter de manière critique le système immunitaire, le métabolisme et les fonctions neurologiques et avoir des conséquences pouvant persister tout au long de la vie de l'individu (Barker 2004),
- les faibles capacités de métabolisation et d'élimination des xénobiotiques du fœtus et du nouveau-né (Anderson *et al.* 1989) sont susceptibles de conduire à une accumulation importante des composés au sein de l'organisme,
- les besoins en nutriments du jeune sont plus importants que ceux de l'adulte, il consomme donc en proportion de sa taille et de son poids de plus grandes quantités de nourriture et est peut être ainsi exposé à de plus fortes doses de contaminants.

II.1.1.2. Caractérisation des expositions

L'enfant au cours de ses premiers mois de vie, peut être contaminé par voie alimentaire. Alors exclusivement nourri avec du lait maternel, il est indirectement soumis à l'exposition de sa mère et aux quantités de contaminants susceptibles d'être transférées dans le lait maternel. Il peut également être exposé à des substances potentiellement toxiques en différents lieux (à domicile, à l'école, au terrain de jeu), par inhalation, par contact ou par ingestion de composés chimiques (Diapouli *et al.* 2007). Bien que les émissions toxiques soient ubiquitaires, la vie en milieu urbain contribue à augmenter l'occurrence de pathologies développementales chez les enfants (Chuang *et al.* 1999, New York City Department of Health 1998), du fait notamment de leur importante sensibilité à certains composés

atmosphériques, tels que les matières particulaires, l'ozone et le dioxyde de soufre, susceptibles d'induire des troubles de la fonction respiratoire et d'autres symptômes plus ou moins sévères. Par ailleurs, la pollution de l'air intérieur est à prendre en compte pour les nourrissons, qui y sont majoritairement exposés du fait qu'au cours des premiers mois de vie, ils passent la majorité de leur temps dans des espaces clos. Ainsi, au cours de la période périnatale, l'individu peut être exposé à des substances toxiques par transfert maternel au cours de la gestation, de l'allaitement ou par exposition directe.

II.1.1.3. Transfert mère-jeune des composés chimiques

D'une part, le placenta, souvent décrit comme un filtre protecteur pour le fœtus est en réalité une interface dynamique et flexible autorisant le transport des éléments essentiels et des nutriments entre la mère et le fœtus. Il assure ainsi les principaux échanges physiologiques entre les deux compartiments, permettant également le passage de composés toxiques auxquels peut être exposée la mère (Andersen *et al.* 2000). Le transfert de ces composés vers le fœtus s'opère via un gradient de concentration, assurant le passage adéquat de substances nécessaires à la croissance fœtale (Salama *et al.* 1993). Certains xénobiotiques peuvent alors mimer ces substances ou se lier à elles de sorte à emprunter les mêmes voies de circulation. Le transfert s'effectue le plus souvent par diffusion passive des molécules, dont les quantités et la perméabilité dépendent de leurs caractéristiques physico-chimiques (degré d'ionisation, solubilité dans les lipides, poids moléculaire), des paramètres pharmacocinétiques maternels et des facteurs placentaires (épaisseur, systèmes de transport, contenu lipidique et protéique du placenta) qui sont variables en fonction de la gestation. De plus, le flux sanguin, la perméabilité et le métabolisme placentaires sont des mécanismes dynamiques qui évoluent au cours de la gestation (Slikker 1994).

L'étude du passage placentaire des HAP chez le rongeur a révélé que certains composés (B(a)P, 7,12-dimethylbenz(a)anthracène et 3-methylcholanthrène) étaient largement distribués dans les tissus maternels et fœtaux (EC 2002). Certains travaux sur le B(a)P montrent en particulier que sa concentration mesurée chez le fœtus est plus faible que celle dosée dans les tissus maternels (Withey *et al.* 1993, Neubert et Tapken 1988). Par ailleurs, des études réalisées chez l'homme ont montré la présence de sept HAP dans le placenta de femmes ukrainiennes vivant en milieu urbain (Gladen *et al.* 2000) et des concentrations en HAP (B(a)P, dibenzo(a,c)anthracène et chrysène) dans le placenta, le sang maternel et majoritairement dans le sang du cordon ombilical de femmes indiennes non fumeuses (Madhavan et Naidu 1995), démontrant la capacité de ces composés à traverser la barrière placentaire et ainsi à contaminer le fœtus. De plus l'administration de substances neuroactives chez la rate gestante

a révélé des atteintes cérébrales permanentes chez le fœtus, soulignant l'extrême sensibilité du système nerveux central aux échanges régis par le placenta (Stanton et Spear 1990). Ainsi, l'exposition du fœtus à des contaminants environnementaux via l'organisme maternel est susceptible de perturber sa croissance normale et son développement cérébral (Jacobson et Jacobson 2002, 1996).

D'autre part, le lait maternel, aliment exclusif du jeune pendant ses premiers mois de vie, constitue un biomarqueur intéressant dans l'évaluation des niveaux d'exposition des individus aux HAP, du fait de sa teneur lipidique élevée qui favorise l'accumulation des composés dans les glandes mammaires et les tissus gras. L'analyse des concentrations de HAP présents dans le lait maternel constitue de plus un paramètre pertinent dans l'évaluation du risque chez l'enfant (Abballe *et al.* 2008).

De telles mesures, déjà largement effectuées dans des laits artificiels et animaux (Grova *et al.* 2002), n'ont que très peu été réalisées dans le lait maternel. La plupart de ces travaux, ayant porté sur l'analyse de composés majoritairement présents en phase particulaire, a révélé des concentrations en HAP très variables, allant de quelques ng/kg à plusieurs centaines de µg/kg de lait (Kishikawa *et al.* 2003, Madhavan et Naidu 1995). Del Bubba *et al.* (2005) ont par la suite développé une méthode capable de quantifier des composés volatils à de faibles niveaux de concentrations dans le lait et ainsi déterminé la présence de fluorène et d'acénaphthylène à des taux relativement importants dans le lait maternel (respectivement 1,06 et 6,95 µg/kg de lait). L'étude de Kishikawa *et al.* (2003) a par ailleurs permis de confirmer la relation existante entre la teneur en matières grasses et la concentration en HAP totale présente dans le lait maternel. La teneur lipidique moyenne dans le lait maternel est d'environ 40 g/l, mais elle varie fortement (de 3 à 180 g/l) suivant l'heure de la tétée, l'âge de l'enfant, le volume ingéré, la morphologie de la mère et son alimentation. De plus, la proportion dans le lait maternel double au cours de la période d'allaitement. La synthèse des lipides étant un processus long et complexe, ils ne se concentrent dans le lait qu'à la fin de la tétée. L'ensemble des facteurs décrits va ainsi contribuer à influencer le transfert des HAP et de leurs métabolites dans le lait maternel.

Par ailleurs, l'étude de Zanieri *et al.* (2007) est la première à s'être intéressée aux origines de la contamination du lait maternel en HAP, en cherchant à évaluer les corrélations entre les concentrations de ces composés dans le lait et certains facteurs modulant l'exposition, tels que le régime alimentaire, le lieu de vie et les habitudes tabagiques de la mère. Il est ainsi apparu que le tabagisme constitue un facteur prédominant dans la contamination du lait maternel en HAP, et en particulier en HAP de faible poids moléculaire comme le fluorène. De plus, le lait maternel des femmes vivant en zone urbaine est apparu plus fortement contaminé que celui des femmes vivant en milieu rural prouvant ici encore l'importance du lieu d'habitation dans les niveaux de contamination. Dans cette étude, le risque de

contamination du nourrisson par le lait maternel a été estimé sur la base du seuil acceptable d'absorption quotidienne de B(a)P par l'eau de boisson. Les résultats montrent ainsi que les enfants nés de mères fumeuses vivant en milieu urbain ingèrent quotidiennement 100 à 1 000 fois plus de HAP par rapport à la limite autorisée, ce qui pose d'autant plus la question du risque toxique de cette exposition pour l'enfant.

De plus, l'accumulation de POP, de type PCDD/F et PCB, a pu être mise en évidence chez le jeune allaité, un an après sa naissance. Les concentrations des composés retrouvées dans la fraction lipidique du sang des enfants à 1 an étaient de 1,5 à 3,6 fois plus importantes que celles observées chez la mère au même moment (Abraham *et al.* 1998).

Ces études montrent ainsi à la fois le risque de contamination alimentaire du nourrisson par la présence de HAP dans le lait maternel et le risque d'intoxication à long terme du fait de l'accumulation potentielle des POP chez l'enfant.

II.1.2. Personnes exposées en milieu professionnel

II.1.2.1. Caractérisation des expositions

Concernant le milieu professionnel, les codes du travail et de la sécurité sociale ainsi que de nombreuses directives et textes réglementaires visent à réglementer l'utilisation professionnelle des substances chimiques et la protection des personnes exposées. Les niveaux d'exposition à des substances toxiques des individus en situation de travail étant globalement estimés être de l'ordre de 100 à 1 000 fois supérieurs à ceux auxquels est exposée la population générale, les personnes en situation de travail particulièrement sensibles, telles que les femmes enceintes ou allaitantes sont de fait précisément concernées par ces mesures. En particulier, les actions de prévention quant à l'utilisation de substances reprotoxiques visent à anticiper tout effet nocif pour le fœtus lors d'une exposition de la mère pendant la gestation. En France, des recommandations spécifiques, élaborées par le groupe de travail de la « Société Française de Médecine du Travail » et approuvées par le Conseil scientifique de la Société, sont destinées aux médecins du travail chargés du suivi des salariées enceintes (SFMT 2005).

II.1.2.2. Lien avec l'individu en développement

Malgré l'existence de nombreuses études prouvant le caractère délétère d'expositions prénatales aux POP, peu de travaux se sont attachés à déterminer les conséquences des expositions en milieu de

travail, autre que des effets de type cancérigène. L'exposition des parents avant la conception, pendant la gestation et/ou l'allaitement constituent au-delà des risques individuels, des dangers potentiels pour l'enfant (Cordier *et al.* 2004). En dépit d'études épidémiologiques menées dans ce sens ces dix dernières années, aucune exposition spécifique n'a pu directement être reliée à une pathologie, la plupart des études rapportant leurs résultats à des domaines d'activité généraux.

Le lien existant entre l'exposition professionnelle des parents et l'augmentation du risque tératogène a été mis en évidence à partir de 1974 par Fabia et Thuy. Depuis, plusieurs études ont montré que certaines activités professionnelles exposant les parents à des HAP (chauffeur, mécanicien, machiniste, peintre, ...) favorisaient la survenue de cancers chez les enfants. Un risque plus important a également été rapporté au sein de populations d'enfants nés de parents travaillant dans des domaines associés à l'agriculture (Kristensen *et al.* 1996), l'électricité (Johnson et Spitz 1989), le bâtiment (Kristensen et Andersen 1992), l'automobile, les industries chimiques et pétrochimiques (Nasca *et al.* 1988), le textile et le papier (Cordier *et al.* 2001). L'exposition professionnelle à des composés de type HAP a ainsi été associée dans plusieurs pays européens principalement à l'augmentation du risque de tumeurs cérébrales chez le fœtus (Cordier *et al.* 1997).

II.2. Particularités de la voie inhalatoire

La cavité nasale constitue pour les polluants atmosphériques une voie d'entrée directe au SNC. Les récepteurs olfactifs des cellules dendritiques étant en contact direct et permanent avec l'environnement, la voie neuronale de transport constitue une route d'accès privilégiée au SNC pour les composés toxiques. Depuis l'épithélium sensitif, ces récepteurs projettent vers le bulbe olfactif, alors premier relais synaptique de la voie olfactive (Lin et Ngai 1999). L'efficacité de la barrière qui sépare les voies nasales du SNC dépend ainsi de l'intégrité de l'épithélium olfactif et des capacités de métabolisation de l'organisme (Dahl et Lewis 1993). L'inflammation chronique des voies respiratoires provoquée par l'exposition aux polluants atmosphériques déclencherait d'ailleurs une cascade d'événements impliquant le SNC (Caderón-Garcidueñas *et al.* 2007, 2002).

II.3. Effets de la pollution liée aux HAP

II.3.1. Neurotoxicité chez l'adulte

Au cours des 20 dernières années, l'étude de l'exposition des individus aux contaminants

environnementaux a révélé des effets délétères sur l'organisme parmi lesquels des déficits neurocomportementaux (Wormley *et al.* 2004). Dès lors, de nombreuses auteurs se sont intéressés au lien existant entre neurotoxicité et/ou maladies neurodégénératives et expositions environnementales (Spencer 1992). En particulier, l'administration de B(a)P et de fluoranthène par voie orale chez le rongeur a montré des perturbations comportementales telles qu'une diminution de l'activité motrice, une augmentation du temps de réponse aux stimuli sensoriels et des déficits neuromusculaires plus importantes chez les mâles que chez les femelles (Saunders *et al.* 2003, 2002, 2001). La dernière de ces études a également permis de mettre en évidence qu'à fortes doses, les effets neurotoxiques du fluoranthène apparaissent plus tôt (2 heures après l'administration) et persistent davantage (48 heures) qu'à faibles doses. D'autres travaux ont également montré que les concentrations de fluoranthène et de ses métabolites sont maximales 1 à 2 heures après administration par voie orale, puis graduellement décroissantes (ATSDR 1995). Par ailleurs, l'exposition à des microinjections de fractions de particules diesel, riches en HAP, ont causé chez le rat des lésions neuronales au niveau de l'hippocampe et du striatum (Andersson *et al.* 1998).

Chez l'homme, des symptômes neurotoxiques associés à des dérégulations végétatives et des déficits de mémorisation à court terme, dont l'importance des troubles était dépendante du niveau d'exposition au B(a)P, ont été mis en évidence chez des individus travaillant en milieu industriel en Pologne (Majchrzak *et al.* 1990). L'exposition au B(a)P d'individus travaillant dans une cokerie en Chine a également révélé des atteintes neurocomportementales telles que des perturbations du système nerveux autonome et l'implication de certains neurotransmetteurs, notamment l'acétylcholine (Niu *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2009). Selon les auteurs de cette dernière étude, l'acétylcholine constituerait un bon marqueur de la neurotoxicité induite par l'exposition au B(a)P.

Actuellement, les mécanismes qui sous-tendent les modifications comportementales observées après exposition aux HAP ne sont que très peu connus. Certains auteurs affirment néanmoins que ces composés sont susceptibles de moduler l'activité comportementale par des effets directs sur les systèmes dopaminergique et noradrénergique, par l'inhibition de la tyrosine hydroxylase et potentiellement par l'inhibition de l'acétylcholinestérase (Saunders *et al.* 2003). Par ailleurs, une diminution de la sécrétion d'enzymes antioxydants au niveau des poumons, du foie et des reins après une exposition aiguë aux HAP laissent supposer que le stress oxydatif peut être impliqué dans la neurotoxicité des composés de cette famille.

II.3.2. Neurotoxicité prénatale

A l'heure actuelle, peu de données concernant la neurotoxicité de l'exposition précoce aux HAP sont disponibles. La réglementation actuelle concernant le test de nouvelles substances n'exigeant aucune évaluation des effets neurotératologiques pour la classification des composés (Rodier 2004), très peu d'études visant la protection des individus face aux expositions neurotoxiques sont menées.

Le SNC est le système le mieux connu de l'organisme, aussi bien au plan de son développement normal que des perturbations qui peuvent l'affecter. Comparé aux autres organes, il est particulièrement vulnérable pendant une période relativement longue de la vie de l'individu, de la vie fœtale à la période pré-pubertaire. Chez les mammifères, la période périnatale est caractérisée par une croissance cérébrale rapide, associée à de nombreuses modifications biochimiques conduisant à la formation du cerveau mature. L'exposition à des composés toxiques au cours de cette phase du développement cérébral, au cours de la gestation et/ou de l'allaitement, peut influencer la maturation cérébrale du jeune de manière à altérer des processus histologiques et cytochimiques. La neurotoxicité développementale se caractérise alors par l'apparition de troubles fonctionnels, tels que des modifications comportementales, neurohistologiques, neurochimiques, neurophysiologiques ainsi que des dimorphologies plus ou moins critiques du système nerveux central du jeune exposé *in utero* ou au cours de l'allaitement à des composés chimiques. Pour induire ces effets, les composés et leurs métabolites doivent entre autres franchir les barrières placentaire et hémato-encéphalique (Andersen *et al.* 2000). Le transfert étant dépendant de la solubilité des composés dans les lipides, les composés identifiés comme neurotoxiques chez l'adulte sont aussi potentiellement capables de traverser le placenta, d'atteindre le fœtus et le cerveau en développement (Andersen *et al.* 2000).

Chez les rongeurs, le système cholinergique se forme rapidement après la naissance, période durant laquelle le développement neuromoteur connaît des pics d'activité. Eriksson *et al.* (2001, 2000, 1997) ont observé que l'exposition de souriceaux à de faibles doses de POP au cours de cette période critique de croissance cérébrale était susceptible d'induire des changements irréversibles à l'âge adulte, tels qu'une modification des récepteurs cholinergiques au niveau cérébral et des troubles comportementaux. De plus, l'exposition *in utero* à des émissions de particules diesel, qui contiennent de nombreux HAP, a été associée à une diminution significative des performances d'apprentissage chez la souris, ainsi qu'à des déséquilibres émotionnels associés aux systèmes sérotoninergiques et dopaminergiques au niveau cérébral (Takeda *et al.* 2004). L'étude de l'exposition transplacentaire de rats au B(a)P a par ailleurs montré une diminution significative du nombre de sous-unités NR1 du récepteur NMDA au niveau de l'hippocampe et des déficits de potentialisation à long terme à la naissance, marqueur des capacités

d'apprentissage et de mémoire à long terme (Wormley *et al.* 2004).

De plus, des études épidémiologiques réalisées en différents lieux, ont montré que des enfants nés durant un épisode de pollution majeur en République Tchèque présentaient des troubles de l'apprentissage potentiellement liés aux concentrations atmosphériques alors élevées en HAP (Otto *et al.* 1997). En Pologne, une étude similaire a révélé des perturbations du développement neurocognitif chez les jeunes exposés *in utero* à d'importantes émissions industrielles (Jedrychowski *et al.* 2003). Par ailleurs, un allongement de la période de développement de l'activité locomotrice a été observé chez des enfants chinois exposés en période prénatale aux HAP (Tang *et al.* 2008). De plus, l'exposition *in utero* aux HAP, caractérisée par la présence d'adduits à l'ADN dans le sang du cordon ombilical d'enfants new yorkais, a été associée à une réduction de l'index du développement mental des enfants à 3 ans (test « Bayles Scales of Infant Development ») (Perera *et al.* 2003). Des études ultérieures réalisées à New York ont permis de souligner ce lien en montrant que l'exposition prénatale à d'importantes concentrations atmosphériques en HAP (médianes de 2,26 ng/m³) était négativement corrélée aux scores de tests d'intelligence des enfants à 5 ans (Edwards *et al.* 2010, Perera *et al.* 2009). De plus, l'exposition prénatale à la fumée de cigarette a montré chez des enfants un déficit des capacités d'apprentissage et d'attention, ainsi qu'une baisse du QI, affectant ainsi les performances scolaires (*et al.* 2006).

Ainsi, les études ayant porté sur l'évaluation les effets neurotoxiques des expositions environnementales ont révélé des troubles sévères et irréversibles chez le jeune exposé *in utero* à des composés chimiques connus. A ce jour, les mécanismes à travers lesquels les HAP affectent le développement cérébral ne sont pas complètement connus. La toxicité fœtale peut être causée par diverses perturbations, incluant des dérèglements endocriniens (Takeda *et al.* 2004, Archibong *et al.* 2002, Bui *et al.* 1986), la réduction des échanges en oxygène et nutriments au niveau du placenta (Dejmek *et al.* 2000), des dommages à l'ADN impliquant l'activation de mécanismes apoptotiques (Wood et Youle 1995, Nicol *et al.* 1995), des perturbations de l'expression des gènes, des effets épigénétiques ou l'inhibition du système antioxydant au niveau cérébral (Saunders *et al.* 2006). L'élaboration d'une base de données cinétique du passage placentaire des composés, de leurs capacités à être accumulées et métabolisées au niveau du placenta et du fœtus s'avère aujourd'hui essentielle compte tenu du nombre important de substances présentes dans l'environnement potentiellement neurotoxiques pour le fœtus (Andersen *et al.* 2000).

II.3.3. Effets reprotoxiques

Les données issues de l'expérimentation animale et humaine ont déjà permis de révéler que l'exposition à de nombreux composés chimiques environnementaux et présents en milieu professionnel sont susceptibles d'altérer le système reproducteur et les mécanismes de contrôle endocrinien, parmi lesquels les HAP (ATSDR 1995). Outre les effets neurotoxiques, les risques encourus par l'individu en développement exposé à des substances de type HAP peuvent se révéler particulièrement sévères du fait du potentiel cancérigène de ces composés.

Une étude canadienne, réalisée chez l'animal dans le but de modéliser l'exposition du fœtus à un mélange de pesticides présents dans le sang d'individus consommant des poissons des Grands Lacs, a montré que l'ingestion par des rates gestantes de 15 mg/kg/j du mélange de POP induit un taux de mortalité des jeunes de 42 % quatre jours après la mise bas. De plus, une perte de poids, une augmentation du poids du foie et une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques ont été observées chez les mères et les jeunes exposés. Des anomalies développementales et des troubles du comportement ont également été mis en évidence a posteriori chez les jeunes (Chu *et al.* 2008).

L'étude des effets de l'exposition prénatale aux HAP chez l'animal a permis de mettre en évidence de nombreux effets reprotoxiques, tels qu'un taux de mortalité élevé, des malformations et une cancérogénèse transplacentaire (Sanyal et Li 2007, Wormley *et al.* 2004, Whyatt *et al.* 2001, ATSDR 1995, IARC 1983). En particulier, l'exposition au B(a)P a montré une baisse de la fertilité (Kristensen *et al.* 1995), une diminution du poids des nouveau nés à la naissance (Bui *et al.* 1986), des malformations (Barbieri *et al.* 1986, Legraverend *et al.* 1984), des effets immunologiques (Rodriguez *et al.* 1999) et des troubles du comportement sexuel (Csaba *et al.* 1993). De plus, l'étude de l'exposition de rates gestantes à l'inhalation de 25, 75 ou 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de B(a)P, 4 heures par jour, du 11^{ème} au 20^{ème} jour de gestation, a révélé une perturbation des mécanismes hormonaux, tels qu'une diminution des concentrations plasmatiques en progestérone, œstrogène et prolactine. Un faible taux de survie des fœtus ayant subis l'exposition a également été observé comparé au nombre d'embryons détectés au 8^{ème} jour de gestation (Archibong *et al.* 2002). Une étude similaire a également permis de révéler l'induction de cytochrome P450 1A1 et la production de métabolites réactifs chez des rates exposées à l'inhalation de B(a)P au cours de la gestation (Nayyar 2002).

Par ailleurs, les études de cohortes d'enfants nés en Chine et à New York ont montré un lien entre l'exposition transplacentaire aux HAP et une diminution de la croissance fœtale, incluant des diminutions du poids corporel et de la circonférence du cerveau à la naissance (Choi *et al.* 2008, 2006,

Tang *et al.* 2006, Perera *et al.* 2003, 1998, Dejmek *et al.* 2000). De même, une étude réalisée en Pologne a montré chez des nouveaux nés présentant des niveaux d'adduits à l'ADN particulièrement élevés, témoignant de l'exposition aux HAP, une perte de poids significative à la naissance (Perera *et al.* 1998). Au sujet d'un éventuel mécanisme d'action, Huel *et al.* (1993) ont fait l'hypothèse d'une association entre l'exposition aux HAP, l'induction placentaire de l'aryl hydrocarbon hydrolase et des désordres à la naissance.

Les résultats de ces différentes études montrent ainsi que même si la période critique durant laquelle l'organisme est le plus vulnérable aux stimulations environnementales varie entre l'homme et l'animal, l'exposition périnatale aux HAP révèle sensiblement les mêmes atteintes entre les deux espèces.

III. Modèle d'étude

III.1. Evaluation des effets neurotoxiques

Dans le cadre de l'évaluation du risque neurotoxique, des lignes directrices proposent une trame permettant de définir si une substance a des effets neurotoxiques (Boyes *et al.* 1997). En particulier, il s'agit de caractériser la relation « dose-effet », c'est-à-dire la nature des effets neurotoxiques causés par différentes doses et durées d'exposition, ainsi que la relation « dose-réponse », correspondante à l'intensité de l'effet induit. De plus, la multiplicité des effets potentiellement inductibles, la sensibilité particulière de certains individus aux expositions neurotoxiques, les différents niveaux d'organisation biologique du SNC, ainsi que l'ensemble des tests, des mesures et des protocoles employés doivent être pris en compte dans l'évaluation du risque neurotoxique. Par ailleurs, l'action de mécanismes compensatoires, de processus de réparation et des réactions émotionnelles secondaires sont susceptibles de faire évoluer les effets délétères induits par l'exposition. La pertinence d'un résultat dépend donc de la qualité des informations relatives à l'exposition, de la validité et de la sensibilité des tests neurocomportementaux utilisés, de la quantité et de la nature des données disponibles, ainsi que du contrôle des biais et de l'influence potentielle d'autres facteurs (Grandjean *et al.* 1996).

Pour estimer la potentielle neurotoxicité des composés chimiques, l'évaluation comportementale est recommandée parmi les tests de 1^{er} rang. En effet, l'observation comportementale représente

l'unique sortie fonctionnelle du système nerveux et permet la détection précoce des effets neurotoxiques (Crofton *et al.* 1989, Haggerty 1989, Tilson 1987). Les performances neurocomportementales individuelles sont influencées par plusieurs facteurs, d'une part par des caractéristiques en lien avec l'exposition (dose, chronicité et occurrences d'autres expositions au même moment) et d'autre part par des caractéristiques propres à l'individu (âge et état de santé général définissant sa vulnérabilité). Il s'agit alors de choisir des variables pertinentes permettant de mettre en évidence un potentiel trouble neurocomportemental et de définir les méthodes appropriées pour les quantifier. Les fonctions neurocomportementales relevant de plusieurs composantes qui peuvent être évalués par différentes méthodes, les tests choisis se doivent ainsi d'être réalisables et sensibles aux effets comportementaux visant à être mis en évidence. Les résultats sont alors interprétés compte tenu des modifications comportementales observées, qui se rapportent à des facteurs principaux impliqués dans les différentes tâches proposées par les tests. De plus, les fonctions neurocomportementales pouvant varier d'une population à une autre, une même exposition peut induire différentes réponses entre les individus. Par ailleurs, d'infimes perturbations peuvent induire des conséquences délétères à long terme, qu'il est important de ne pas négliger dans toute interprétation (Grandjean *et al.* 1996). En particulier, dans l'étude des effets d'expositions prénatales, le moment de l'évaluation neurocomportementale est primordial du fait que certains effets délétères peuvent apparaître uniquement en période précoce et non plus à l'âge adulte ou inversement du fait du niveau de maturité du SNC (Ahlbom *et al.* 1995).

III.2. Caractéristiques de l'expertise animale

III.2.1. Extrapolation des données

Les études toxicologiques ayant recours au modèle animal ont permis de cerner les effets délétères et les mécanismes d'action de nombreuses drogues et composés chimiques et de déterminer les doses susceptibles d'être dangereuses pour l'homme.

Les études d'exposition des animaux au cours de la gestation permettent ainsi d'évaluer les risques potentiellement reprotoxiques chez l'homme et les conséquences éventuelles de l'intoxication du fœtus. Les différences structurelles, physiologiques et biochimiques observées entre l'homme et le rongeur et en particulier celles propres aux périodes de gestation et de développement du fœtus posent néanmoins la question de la pertinence d'utilisation de ce modèle dans l'évaluation des risques et l'extrapolation des mécanismes de transfert (Brent 2004). En effet, la transposition des données de l'animal à l'homme s'avère limitée par plusieurs critères. L'existence de plusieurs souches de rats, les temps d'exposition limités des animaux comparé à la réalité humaine, l'obligation de tester des doses plus fortes que celles rencontrées dans la réalité et les conditions strictes imposées par l'expérimentation animale, souvent contraires aux situations d'exposition réelles constituent des biais à l'extrapolation des résultats.

Par ailleurs, des composés reconnus comme cancérigènes chez l'homme adulte, le sont également chez le rongeur (Allen *et al.* 1988), mais la réciprocity est moins évidente (Pritchard *et al.* 2003). La littérature indique néanmoins des propriétés qualitatives et quantitatives de base similaires entre l'homme et le rongeur concernant l'exposition à des composés chimiques carcinogènes. Pour l'interprétation des effets dose-réponse, un facteur de sécurité correspondant à la différence de sensibilité entre les espèces, relatif à des paramètres toxicocinétique et toxicodynamique, est appliqué. Un facteur compris entre 1 et 4 est établi pour la transposition des données entre différentes espèces animales et est fixé à 10 pour l'extrapolation à l'homme.

Par ailleurs, les valeurs limites définies pour des expositions professionnelles sont calculées sur la base de celles établies chez l'animal. Ainsi la dose reconnue sans effet sur le développement chez le rat est généralement rapportée à une personne de 60 kg exposée quotidiennement en considérant qu'elle inhale un volume de 10 m³ au cours de sa journée de travail. L'application de facteurs de sécurité inter-espèce et interindividuel permettent ainsi de définir des valeurs toxicologiques sans effet sur le développement ainsi que des valeurs guides pour le développement (correspondant à 1/10^{ème} de la valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) et/ou de la valeur limite de l'indicateur biologique

d'exposition (IBE)). Les autorisations de travail sont ainsi déterminées en fonction de la proximité de la personne à un poste où l'exposition moyenne est inférieure à la concentration calculée. Les concentrations dans l'urine du composé et/ou de ses métabolites sont également prises comme indicateur de l'exposition en milieu professionnel. Étant donné le manque de données toxicologiques pour de nombreuses substances, il est recommandé en milieu professionnel de retranscrire l'ensemble des informations concernant les expositions chimiques. Les médecins du travail ont également pour charge de vérifier bibliographiquement l'absence de risques connus pour la reproduction et de renseigner dans le dossier médical toutes données et anomalies concernant la grossesse des salariées.

III.2.2. Particularités développementales

Concernant l'organisme en développement, plusieurs études ont montré que l'enfant et le jeune animal ont de plus faibles capacités de métabolisation des composés toxiques avec pour conséquences un risque différent de celui de l'adulte (Anderson *et al.* 1989). Le développement gestationnel chez l'homme et le rongeur se divise généralement en deux phases, une première période caractérisant le développement embryonnaire et une deuxième période définissant la croissance fœtale (Moore 1988) (**Figure 2**). La croissance embryonnaire étant sensiblement identique en tant que processus chez tous les vertébrés, ce sont les fenêtres temporelles de ces différents processus qui varient entre les espèces (Clancy *et al.* 2001). Ainsi, une maturation neuronale se produisant essentiellement *in utero* caractérise les espèces dites prénatales ou précoces. D'autres espèces dites postnatales ou immatures (lapins, chats, hamster, rats et souris), présentent un développement cérébral essentiellement après la naissance ce qui implique chez ces animaux, une sensorialité réduite (paupières closes), des capacités locomotrices limitées (**Figure 3**) et l'absence de thermorégulation à la naissance. Sur la base des mêmes critères, le développement cérébral chez l'homme est qualifié de prénatal dans le sens où une maturation cérébrale se met en place lors de la grossesse (réflexes moteurs fonctionnels dès 8 semaines d'âge gestationnel), et qu'elle se poursuit après la naissance au cours des 2 – 3 premières années de vie (**Figure 4**).

La plupart des effets fonctionnels pouvant être mis en évidence grâce à des tests neurocomportementaux chez le rongeur peuvent être transposés à l'homme, permettant ainsi la comparaison entre ces deux espèces (Tilson 1987). En terme de développement cérébral, le rat est considéré comme un bon modèle pour l'homme. Il est aussi admis, qu'au plan de la maturité cérébrale, un raton à la naissance équivaut à un prématuré humain de 6 mois, et qu'à 10 jours de vie postnatale, le jeune raton est représentatif d'un bébé humain à terme.

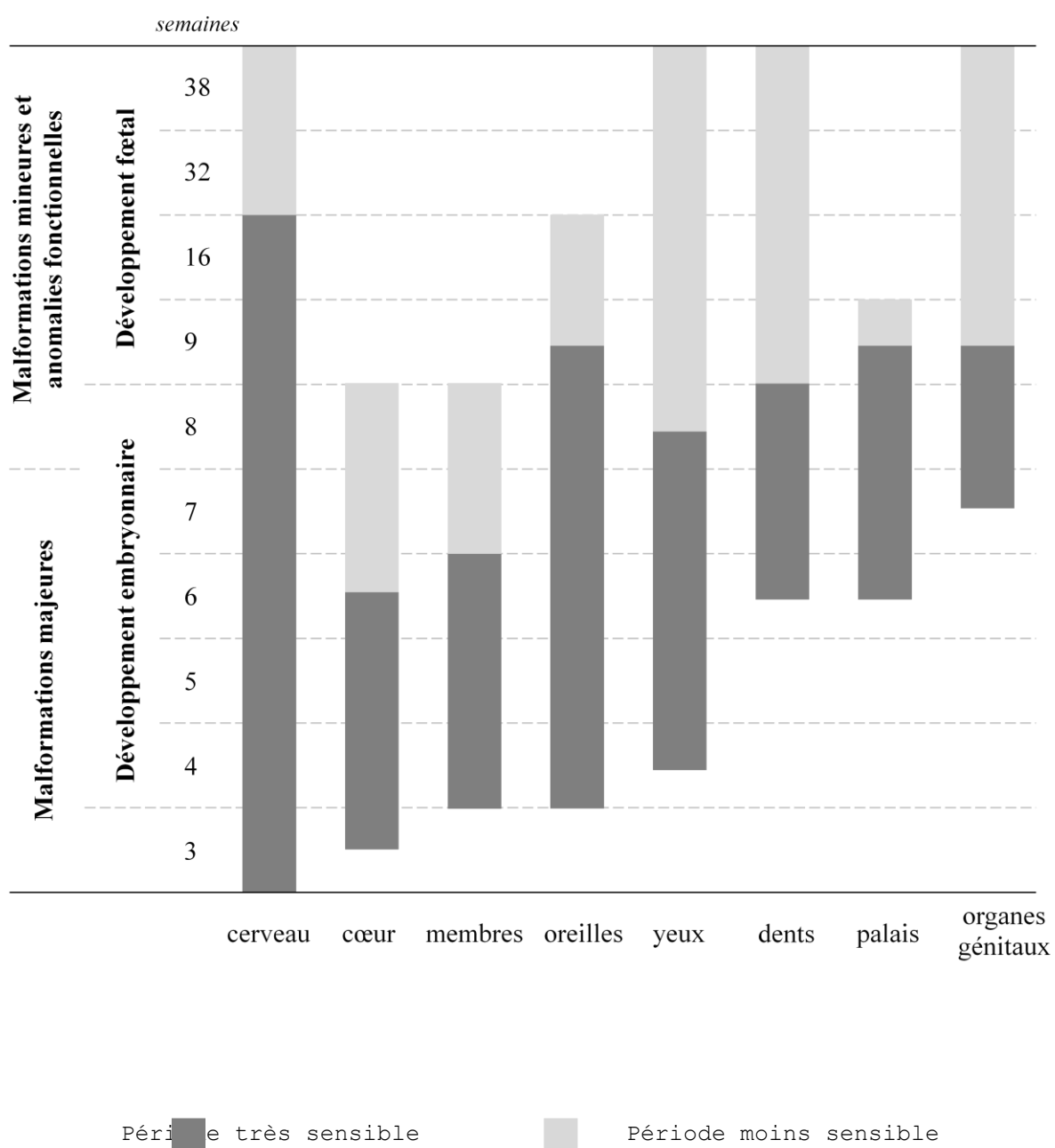


Figure 2 : Périodes critiques du développement humain (D'après Moore 1988)

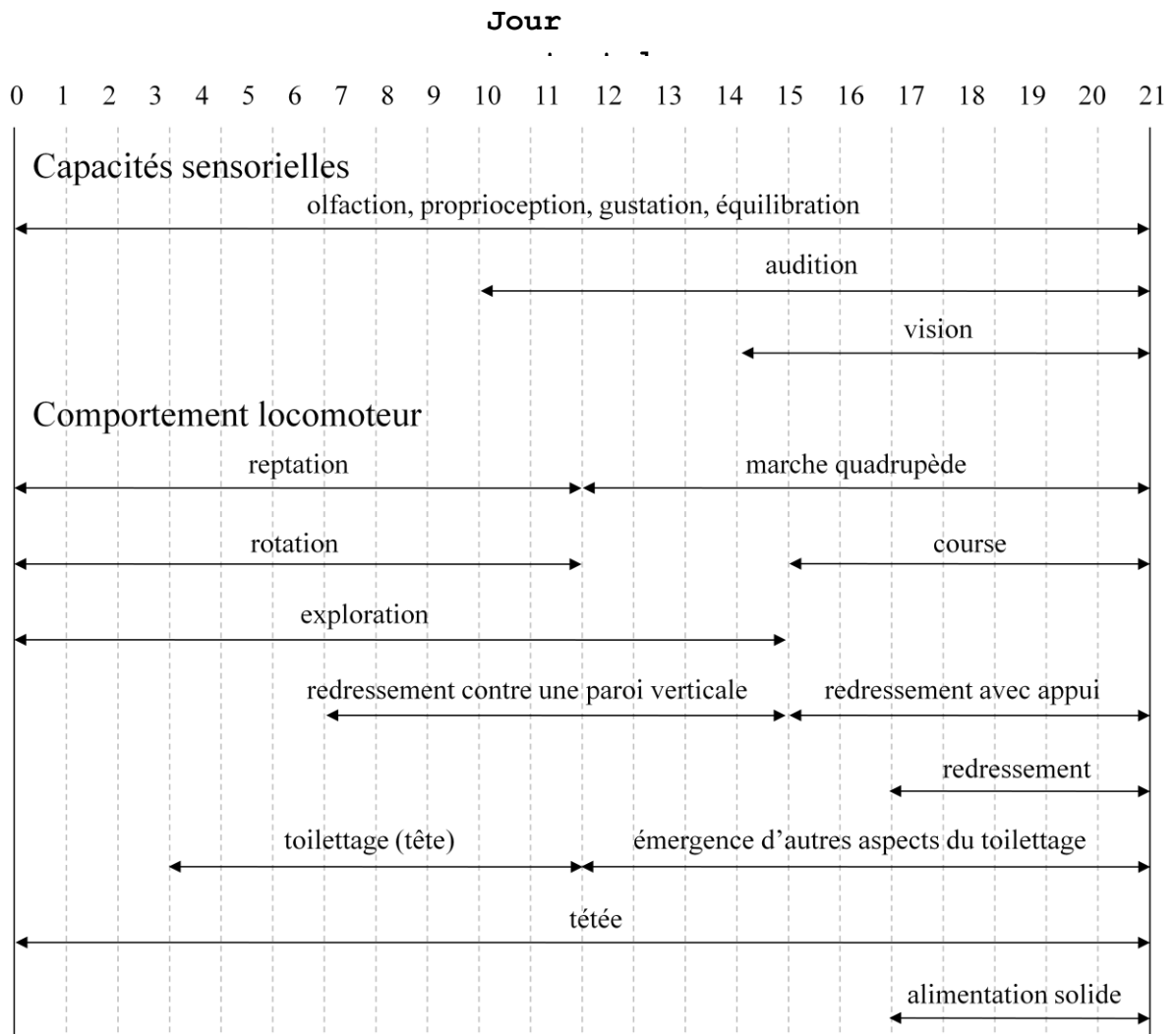


Figure 3 : Développement des capacités sensorielles et motrices chez le rat
(D'après Spear 1990)

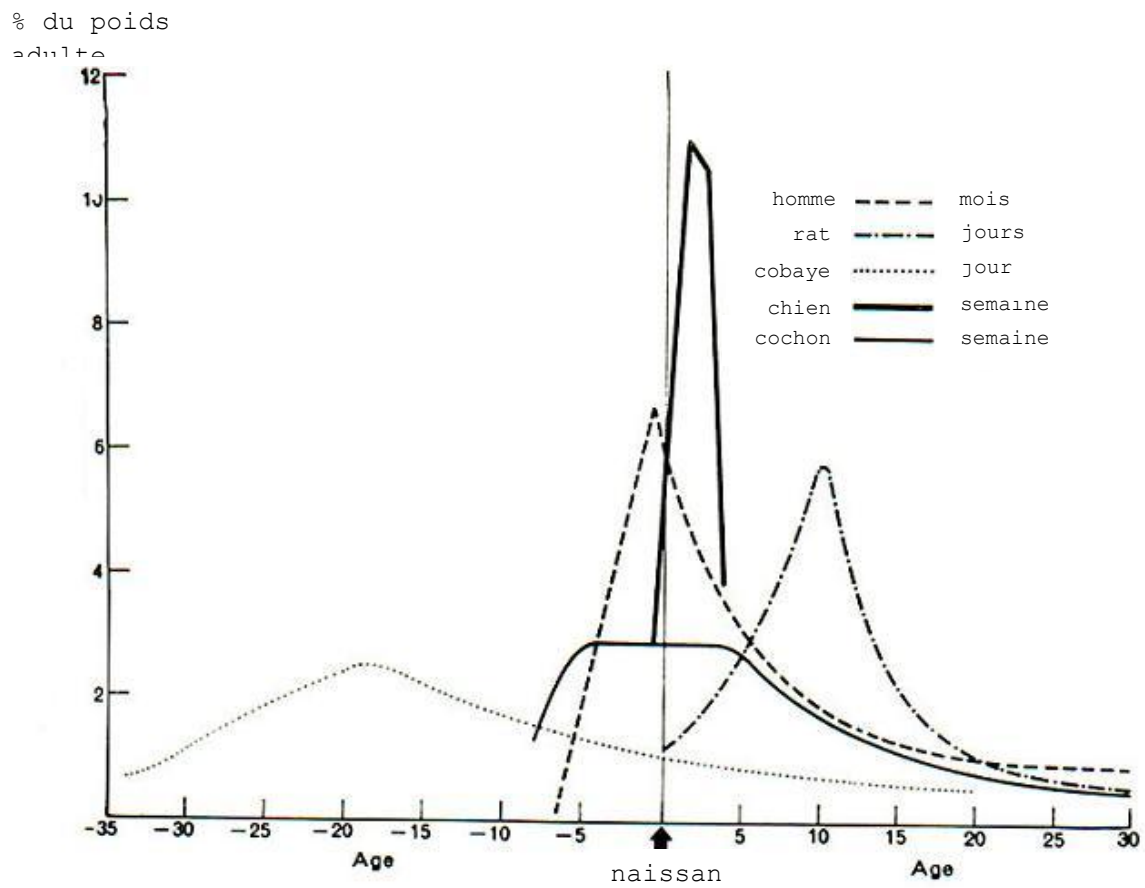


Figure 4 : Développement cérébral de différents mammifères (D'après Dobbing 1975)

III.3. Modèle d'exposition

Sur la base d'un modèle d'exposition établi conjointement avec l'INRS, trois études visant à évaluer les effets de l'exposition à l'inhalation de fluorène ont été menées. La molécule choisie et les concentrations calculées sur la base de données d'expositions humaines visaient à modéliser des niveaux de contamination réalistes et à évaluer les conséquences de ces expositions sur le développement précoce et à long terme de l'individu. Ces trois études ont été réalisées suivant le même schéma d'exposition à trois périodes du développement de l'animal dans le but d'établir un parallèle entre les différents moments d'exposition.

III.3.1. Choix des concentrations

Sur la base de données d'expositions humaines, rapportant des concentrations en HAP et particulièrement de fluorène dans le lait maternel, ont été calculés deux niveaux de contamination à tester chez l'animal (Zanieri *et al.* 2007). A partir d'une concentration moyenne en fluorène de 1,5 µg/kg de lait retrouvée dans le lait maternel de femmes non fumeuses vivant en milieu urbain (Zanieri *et al.* 2007) a été calculée la quantité du polluant susceptible d'être ingérée par un nourrisson au cours d'une période d'allaitement de 6 mois (obtenue sur la base d'un facteur de transfert dans le lait de 1%). Cette quantité a été adaptée chez le jeune rat, compte tenu du volume de lait ingéré par l'animal durant 21 jours. Celle-ci a enfin été rapportée à la concentration devant être inhalée par la rate allaitante pour que sur une période de 14 jours, à raison de 6 heures d'exposition quotidienne, le niveau de contamination observé chez l'homme soit modélisé chez l'animal (**Tableau 10**). Une exposition d'un animal à 1,5 ppb (10 µg/m³) de fluorène correspond ainsi à l'exposition d'une femme allaitante vivant en milieu urbain (Kim *et al.* 2008, Zanieri *et al.* 2007). Un niveau de contamination 100 fois supérieur, soit 150 ppb (1 mg/m³) de fluorène, a également été choisi dans le but de modéliser chez l'animal des cas d'exposition professionnelle ou accidentelle au polluant (Niu *et al.* 2010, Unwin *et al.* 2006) (**Figure 5**).

III.3.2. Dispositif d'exposition

L'exposition des animaux, effectuée à l'INRS, a été réalisée grâce à un dispositif permettant d'exposer les animaux à une atmosphère contaminée par voie oro-nasale uniquement (**Photos 1 & 2**). La mise en contention des animaux dans des tubes permettant de les exposer par voie nasale est une méthode communément utilisée dans le domaine de la toxicologie liée à l'inhalation de composés atmosphériques (Narciso *et al.* 2003). L'exposition par voie nasale a été préférée à l'exposition corps

Tableau 10 : Calcul des quantités de fluorène inhalées par jour ou au cours d'une exposition de 6h

	Poids corporel (kg)	Taux respiratoire (m ³ /j)	Quantités de fluorène inhalées	
			1,5 ppb (10 µg/m ³)	150 ppb (1 mg/m ³)
femme allaitante	60	20	145 µg	14,5 mg
nourrisson	5		1,45 µg	145 µg
rate allaitante	0,25	0,262	727 ng	72,7 µg
raton	0,025		7,27 ng	727 ng
			Doses équivalentes	
nourrisson			290 ng/kg/j	29 µg/kg/j

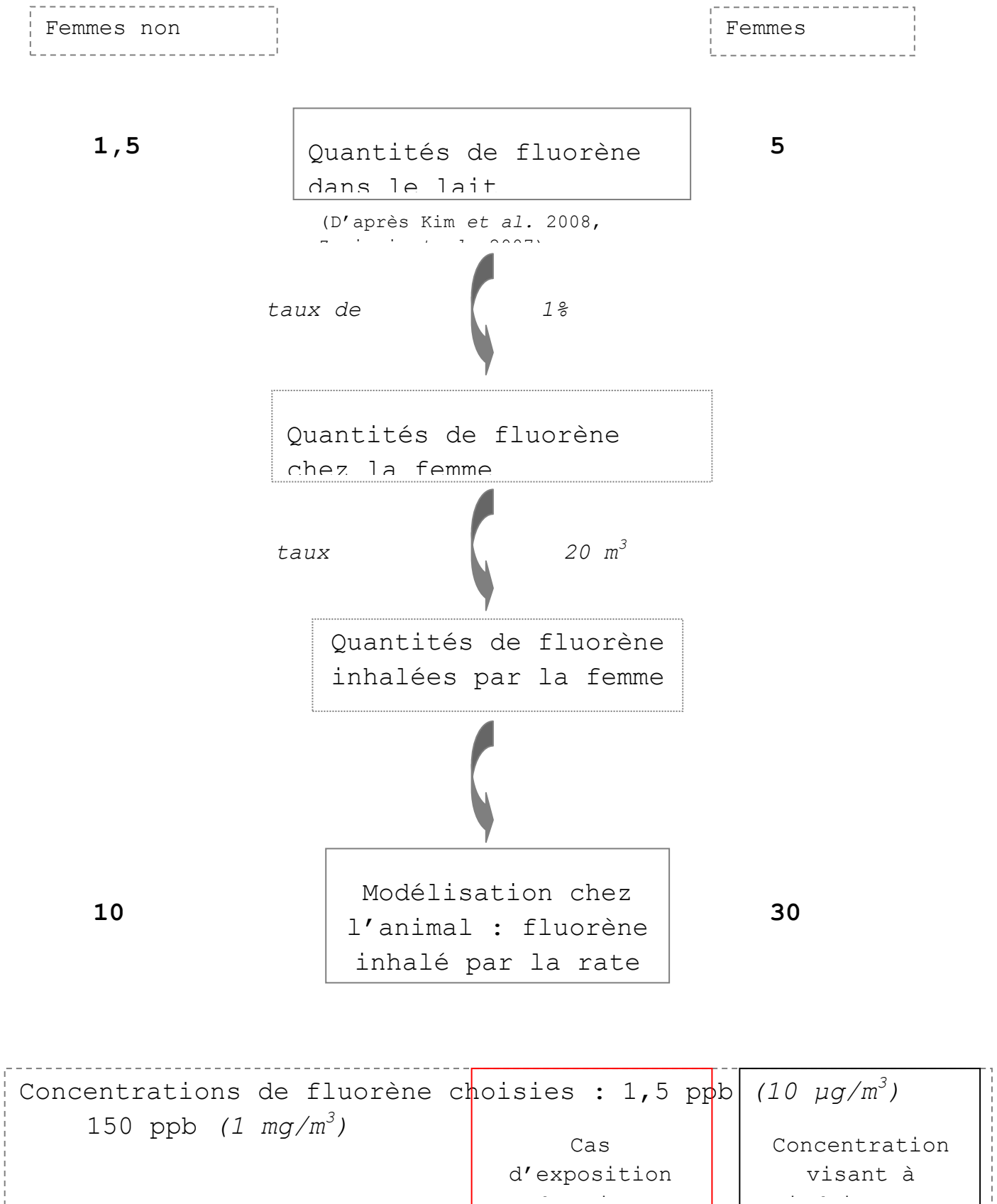


Figure 5 : Choix des concentrations de fluorène testées dans les études d'exposition non inhalation



Photo 1 : Chambres d'inhalation à l'INRS



Photo 2 : Rat placé dans un tube d'exposition par voie nasale

entier des animaux compte tenu des raisons suivantes :

- seul le tractus respiratoire est exposé à l'atmosphère contaminée, les passages par voie orale ou cutanée sont ainsi limités (Tyl *et al.* 1994, Stephenson *et al.* 1988),
- aucune diffusion d'acides de l'urine des animaux n'a lieu dans l'atmosphère des chambres d'inhalation.

La génération de l'atmosphère contaminée en fluorène aux deux concentrations choisies a été mise au point à l'INRS conformément aux lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009). Les concentrations générées dans l'air des chambres d'inhalation, la température et l'humidité relative ont été contrôlées au cours de chaque exposition selon ces mêmes recommandations.

III.3.3. Contrainte liée à l'exposition par voie nasale

L'exposition par voie nasale nécessitait de placer les animaux dans des tubes spécifiques, enserrant le corps du rat et ne laissant émerger que son museau dans la cellule d'inhalation. Le maintien des animaux dans de tels tubes, correspondant à un modèle de stress classiquement utilisé, a ainsi posé la question des effets du stress de contention imposé par l'exposition par voie nasale sur le comportement des animaux (Rothenberg *et al.* 2000). De nombreux travaux, portant sur l'évaluation des effets du stress chronique de contention sur la physiologie des animaux ont révélé d'importantes modifications, telles qu'une augmentation du rythme cardiaque (McDougall *et al.* 2000, Irvine *et al.* 1997), un ralentissement de la croissance corporelle, une diminution du poids du thymus, une augmentation du poids des glandes surrénales et du taux basal de corticostérone plasmatique, ainsi qu'une dérégulation de l'axe HPA (Harris *et al.* 2004, Marquez *et al.* 2004, Zelena *et al.* 2003, Willner 1997). Ce modèle d'exposition étant largement utilisé pour évaluer la toxicité de l'inhalation de composés atmosphériques, se pose la question de l'interaction entre les effets du stress induit par l'exposition et ceux du contaminant testé (King-Herbert *et al.* 1997, Tyl *et al.* 1994). Quelques travaux, ayant en particulier étudié les effets de la contention imposée par les tubes d'exposition par voie nasale, ont montré des modifications physiologiques relatives au stress tels qu'une augmentation du taux respiratoire (Mautz et Bufalino 1989) et de la température corporelle (King-Herbert *et al.* 1997), ainsi que des altérations de la défense immunitaire pulmonaire (Jakab et Hemenway 1989). Dans la plupart des études, pour tenter d'éviter la confusion entre les effets de ces deux facteurs, les animaux sont préalablement habitués au dispositif en étant placés dans les tubes. Narciso *et al.* (2003) ont ainsi montré que le stress imposé par cette situation induisait une augmentation du rythme cardiaque, mais à des niveaux situés dans la norme des niveaux physiologiques. Compte tenu de la température corporelle

et du rythme cardiaque des animaux au cours de la contention, ils ont établi que les rongeurs étaient capables de s'adapter au stress en 14 jours et ont ainsi conclu que la contention imposée par le dispositif ne nuisait pas aux effets de la contamination testée. Contrairement à d'autres études, ils ont aussi observé qu'une habitude à la contention de plus de 14 jours ne facilitait pas l'adaptation au stress.

Le stress de contention est également un modèle utilisé pour induire des modifications comportementales de type anxieux ou dépressif chez le rongeur (Morley-Fletcher *et al.* 2011). Des études ont montré que 6 heures de contention par jour pendant 21 jours induisaient une augmentation de l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé (LCS) (Wood *et al.* 2004) et dans l'open-field (OF) (Beck et Luine 2002). D'autres travaux ont au contraire montré l'absence d'effet d'un tel protocole d'exposition prolongée sur l'anxiété mesurée dans ces deux tests (Gregus *et al.* 2005, Bowman *et al.* 2002). Ce résultat est souvent expliqué par l'habitude de l'animal à l'exposition répétée au stress (Netto *et al.* 2002, Padovan et Guimaraes 2000).

Les expérimentations consistant en l'étude du transfert de la contamination au fœtus et au nouveau né ont par ailleurs posé la question des effets du stress de la mère gestante et allaitante sur le développement du jeune. Des travaux portant sur l'exposition de femelles gestantes à un stress de contention ont montré chez les jeunes une augmentation du taux de mortalité, des portées plus faibles en nombre d'animaux (Baker *et al.* 2008), des changements physiologiques et des malformations au niveau de l'hippocampe (Cherian *et al.* 2010, 2009) ainsi que des perturbations cognitives et émotionnelles (Llewellyn *et al.* 1997, Steiner 1979). Une modification du comportement maternel, caractérisée par une diminution de la qualité et de la fréquence des soins apportés aux jeunes ont par ailleurs été observées chez des femelles gestantes soumises à un stress de contention (Champagen et Meaney 2006, Patin *et al.* 2004, Smith *et al.* 2004, Power et Moore 1986). Des effets persistants à l'âge adulte, telles que des altérations motrices (Grimm et Frieer 1987, Barlow *et al.* 1978), une diminution des capacités d'alternance spontanée (Gué *et al.* 2004) et des capacités d'apprentissage spatial (Yaka *et al.* 2007), une augmentation des comportements désinhibés et de l'activité générale (Dickerson *et al.* 2005) et une perturbation des comportements sociaux (Morley-Fletcher *et al.* 2003) ont également été mis en évidence chez des animaux exposés au stress *in utero*. En particulier, un effet lié au sexe a été révélé chez les animaux adultes, montrant une augmentation du niveau d'anxiété chez les mâles stressés en période prénatale (Cherian *et al.* 2010, 2009).

Bien qu'au plan physiologique les animaux soumis à un stress de contention semblent s'adapter après un certain temps d'exposition à la situation stressante, les nombreuses études menées chez

l'adulte et le jeune en développement ont montré des effets délétères avérés sur la physiologie et le comportemental des animaux. Compte tenu de l'importance de ces effets, ceux-ci ont été mesurés dans les trois études où les animaux sont exposés par inhalation pour tenter de distinguer les effets du stress généré par la situation d'exposition de ceux du polluant, comme le recommande l'OCDE pour les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009).

SECTION METHODOLOGIQUE

I. Introduction

L'ensemble des études menées portant essentiellement sur la détermination des effets de l'exposition au fluorène sur l'activité comportementale des animaux, cette partie est dédiée à la méthodologie d'évaluation employée dans les différents travaux qui ont été réalisés (**Section expérimentale, Chapitre 1, 2 et 3**).

Les protocoles de test permettant d'évaluer l'activité comportementale chez l'animal adulte et la batterie de tests employée dans l'étude du développement sensori-moteur du jeune rat seront successivement présentés.

I.1. Tests à l'âge adulte

Dans le cadre de la recherche préclinique, de nombreux modèles visant à étudier la neurobiologie chez le rongeur ont été développés. Les tests utilisés en expérimentation animale, communément appelés « labyrinthes », s'apparentent à des constructions ou des enceintes adaptées à la taille de l'animal ayant pour but d'observer son comportement exploratoire, ou de le soumettre à une contrainte ou une tâche, pendant un temps défini. L'observation de chaque passage dans un test permet ainsi de relever des variables qui renseignent l'expérimentateur sur le registre comportemental de l'animal.

Les animaux peuvent être confrontés une seule fois ou à plusieurs reprises à un même test, selon les procédures. Lorsqu'il est placé dans un environnement nouveau, qu'il n'a jamais visité, un rongeur exprime un comportement spontané d'exploration. Cette situation, qui combine de multiples stimulations, génère chez l'animal un conflit entre sa disposition innée pour l'exploration et sa crainte des espaces inconnus, cette dualité étant source d'anxiété. Confronté à plusieurs reprises au même test, il est capable de reconnaître certaines caractéristiques spatiales, d'en reconnaître et d'en apprendre les caractéristiques et d'exprimer alors un comportement adapté.

Pour permettre d'extrapoler à l'homme les observations faites chez l'animal, il est nécessaire d'utiliser des tests validés. Dans cette optique, plusieurs critères ont été définis pour pouvoir utiliser chez l'animal un test comme modèle d'évaluation des risques potentiels pour l'homme. Trois composantes comportementales sont majoritairement étudiées chez l'animal adulte : le niveau d'anxiété, l'activité locomotrice et les capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme. Le comportement des animaux résultant de l'expression de ses trois composantes, celles-ci

interagissent constamment les unes avec les autres. Ainsi, le niveau d'anxiété influence l'activité locomotrice, de même que celle-ci est susceptible d'influencer les capacités d'apprentissage et réciproquement. Chaque test a été conçu pour permettre de mesurer en particulier une de ces trois composantes. Néanmoins, l'activité locomotrice peut être appréhendée dans tous les labyrinthes par le relevé de la distance parcourue et du comportement exploratoire. De la même manière, plusieurs tests permettent de rendre compte du niveau d'anxiété chez le rongeur. Par exemple, les tests de l'open-field (OF) et de la boîte claire/obscur (BCO) sont classiquement employés pour étudier l'activité locomotrice et le comportement d'exploration chez le rat, mais ils peuvent également renseigner sur son anxiété. Parmi les tests permettant d'évaluer le niveau d'anxiété, se distinguent en particulier les tests d'*anxiété conditionnée*, dans lesquels l'animal est confronté à un stimulus aversif qu'il ne peut éviter et les tests d'*anxiété non conditionnée*, dans lesquels le rat est placé dans un environnement inconnu qu'il peut explorer librement, mais dont la configuration physique et spatiale induit spontanément l'expression d'un comportement de type anxieux (Millan 2003, Ohl 2003, Belzung et Griebel 2001, Rodgers et Dalvi 1997). Ainsi, dans les études présentes, les animaux ont été évalués avec des tests d'anxiété non conditionnée comme le labyrinthe en croix surélevé (LCS) (Carobrez et Bertoglio 2005), l'OF (Prut et Belzung 2003) et la boîte claire/obscur (BCO) (Bourin et Hascoët 2003).

1.2. Tests du développement sensori-moteur

L'observation des réactions précoces des jeunes rats permet d'évaluer de manière simple le développement essentiellement neuromoteur de l'animal. L'expression du comportement étant quantifiable, la mise en place des différentes fonctions peut ainsi être suivie. L'observation permet aussi de détecter d'éventuels retards ou des troubles permanents dans la maturation de fonctions spécifiques et de situer ces modifications par rapport au stade de développement de l'animal.

Contrairement à certaines espèces animales dites « précoces », telles que le cobaye, dont la plupart des fonctions motrices de bases sont en place dès la naissance (Fox 1966), le rat est une espèce au développement essentiellement postnatal. Il naît avec des aptitudes motrices et sensorielles particulièrement restreintes (les oreilles et les yeux ne sont pas ouverts, il ne thermorégule pas et n'est pas capable de se déplacer). De fait, il est durant les 1^{ers} jours de vie complètement dépendant de sa mère. Cette différence de maturité s'explique par la durée de la gestation, relativement courte chez le rat comparé à d'autres espèces (rat \approx 21 jours, cobaye \approx 68 jours). L'essentiel de son développement moteur et sensoriel s'effectue ainsi durant les trois 1^{ères} semaines de vie postnatale, soit de la naissance au sevrage. Il en va de même, aux échelles de temps près, pour d'autres mammifères non précoces,

comme le chat, le chien, la souris et l'homme (**Figure 4**). Le moment de la naissance n'est donc qu'une étape dans un long processus et sa place dans l'ontogénèse peut être très variable d'une espèce à l'autre. Du fait de son développement sensori-moteur majoritairement postnatal, le rat constitue un bon modèle dans l'étude de la maturation des différentes fonctions cérébrales, celles-ci étant facilement observables par des tests mettant en situation des réflexes moteurs précis. De plus, l'observation des réactions motrices du jeune animal offre un double intérêt. D'une part, elle permet d'étudier la mise en place des différentes fonctions cérébrales et d'autre part, de rendre compte des facteurs pouvant influencer ce développement. De nombreuses études ont ainsi déjà tenté d'établir des liens entre l'évolution des réactions motrices et l'ontogénèse du système nerveux chez l'animal (Altman et Sudarshan 1975, Stelzner 1971, Bolles et Woods 1964, Tilney 1933, Crozier et Pincus 1926), et quelque peu chez l'homme.

Par ailleurs, à la naissance, le nombre de jeunes est variable entre les portées. Selon certains auteurs, la croissance des animaux serait influencée par la taille de la portée, celle-ci étant inversement corrélée au nombre de jeunes constituant la portée (Chahoud et Paumgarten 2009, Deviterne *et al.* 1990, Milkovic *et al.* 1977, Ota et Yokoyama 1967). Lorsque le nombre de jeunes excède le nombre de mamelles (12 chez la rate), une compétition entre les animaux naît pour accéder aux mamelles et se nourrir, ce qui a pour effet de ralentir leur croissance. Pour assurer une prise de poids homogène entre tous les jeunes et prévenir un effet de la croissance corporelle sur la maturation des fonctions motrices et sensorielles, certains auteurs choisissent de standardiser les portées, c'est-à-dire de réduire toutes les portées à un même nombre de jeunes (généralement à 10). Néanmoins, cette pratique peut avoir des conséquences sur le comportement de la mère, ne conduisant non plus à une diminution mais à une augmentation de la variabilité des résultats (Ackerman *et al.* 1977).

Parallèlement à l'expertise des jeunes, il est donc important de s'assurer que le comportement maternel n'est pas ou peu influencé par le protocole d'exposition, celui-ci pouvant avoir des répercussions sur le développement de la portée. Différents tests permettent ainsi d'observer la qualité des soins apportés et les interactions mère-jeunes.

Depuis les 1^{ères} études ayant observé le développement sensori-moteur chez le rongeur (Crozier et Pincus 1933, 1926, Small 1899), de nombreux auteurs ont développé des tests permettant d'évaluer la maturation des systèmes moteur et sensoriel chez le jeune animal. Dès lors est apparu un problème de correspondance entre les différents travaux, dans lesquels les paradigmes étaient adaptés à chaque expertise, ne couvrant pour la plupart qu'une période restreinte du développement précoce de l'animal. L'évaluation de la maturation des fonctions sensori-motrices étant très complexe au plan

méthodologique, du fait de l'intrication d'un grand nombre de facteurs régissant le comportement des animaux, les variations qui ont été générées dans la conception et l'analyse des tests ont rendu impossible la comparaison entre les études.

Ainsi une batterie cohérente de tests visant à évaluer la maturation des systèmes moteur et sensoriel du jeune rat au cours des 1^{ers} stades du développement postnatal a été développée au sein du laboratoire (Gelly 1979). Les critères choisis permettaient alors de centrer chaque réaction motrice de l'animal sur une période précise allant de la naissance au sevrage. Les réactions mesurées étaient de trois types :

- *des actes moteurs complexes* : réflexe de retournement, réaction d'agrippement, perception de la gravité, coordination des quatre membres, force physique et résistance à la fatigue,
- *une réaction motrice simple* : sursaut suite à une stimulation sonore,
- *un indice physique de développement* : ouverture des yeux.

La croissance maximale du cerveau du rat ayant lieu durant les trois 1^{ères} semaines de vie postnatale (Dobbing et Sands 1979), une exposition supposée à risque durant cette période est susceptible d'induire des perturbations dans la mise en place des fonctions cérébrales et par conséquent altérer le développement sensori-moteur de l'animal.

II. Considérations méthodologiques

II.1. Tests à l'âge adulte

Le comportement spontané de l'animal est naturellement influencé par un très grand nombre de paramètres :

- *souche et origine des animaux testés*,
- *conditions d'hébergement* : taille des cages d'habitation, nombre d'animaux dans une même cage (Chesler *et al.* 2002), intensité de l'éclairage de l'animalerie (Rodgers et Dalvi 1997),
- *variations chronobiologiques* : saison, jour de la semaine et heure à laquelle les animaux sont testés (Clénet *et al.* 2006, Andrade *et al.* 2003, Rodgers et Dalvi 1997).

De même que dans le cadre de l'évaluation du développement neurocomportemental précoce, les procédures d'utilisation des tests ont au gré des études été modifiées par rapport à la méthodologie initialement validée, constituant d'autres facteurs faisant varier le comportement de base des rongeurs :

- *conditions de test* : manipulation avant le test (« *handling* »), dimension et éclairage de la pièce d'expérimentation, ordre de passage (Chesler *et al.* 2002), confrontation préalable des animaux à d'autres tests (Rodgers et Dalvi 1997),
- *dispositif* : modification de la configuration des labyrinthes et de leurs propriétés physiques (matériau de construction, dimensions et couleur des tests) (Rodgers et Dalvi 1997, Fernandes et File 1996, Lamberty et Gower 1996, Morato et Castrechini 1989).

Pour accroître la validité écologique du test, les animaux sont généralement maintenus sous un cycle lumineux inversé de manière à ce que les tests aient lieu au cours de leur période d'activité, c'est-à-dire la phase nocturne. Dans ce cas, la pièce d'expérimentation est éclairée par une lumière rouge, qui est faiblement perceptible par les rongeurs (Jacobs *et al.* 2001). Ceux-ci s'orientent alors dans le labyrinthe par rapport à des repères perceptifs autres que visuels.

II.2. Tests du développement sensori-moteur

L'observation d'un comportement moteur nécessite de définir l'ensemble des conditions de déclenchement de la réaction et l'ensemble des critères permettant de considérer que cette réaction a lieu. Toutefois, sur la base de tests initialement mis au point pour l'évaluation du développement sensori-moteur chez l'animal, d'importantes variations dans ces deux ensembles ont été introduites au cours du temps.

Concernant le *matériel* utilisé, des différences en termes de dimensions, de texture de la surface du plan et de configuration spatiale ont été observées. Des paramètres d'importance capitale compte tenu du fait que certaines modifications peuvent introduire un biais dans les résultats obtenus, la réaction observée ne correspondant alors plus au réflexe initialement testé.

De plus, les *procédures* de test diffèrent selon que le test est répété ou ne l'est pas. Or le problème qui survient lors de passages consécutifs est double. L'animal, d'une part, se fatigue au cours des épreuves successives, et d'autre part, est susceptible d'apprentissage. Dans les deux cas, le comportement de l'animal est modifié par la répétition, ce qui pose la question de la représentativité de cette procédure d'évaluation au plan individuel. Suivant les auteurs, l'animal est par ailleurs testé au cours de plusieurs jours consécutifs ou à des âges très différents.

Les *critères définissant le succès ou l'échec* à une épreuve sont également variables selon les auteurs. A la base, il est nécessaire de choisir un paramètre facile à relever, suffisamment précis pour qu'il soit le même pour chaque animal et représentatif de la réaction testée. Les résultats dépendent ainsi du critère choisi. Plus celui-ci est sévère, plus les animaux réussiront tardivement les épreuves, décalant ainsi dans le temps les âges moyens de réussite aux différents tests.

Le mode d'*exploitation des données* varie également selon les auteurs. Le temps mis par un animal pour réaliser une épreuve constitue un paramètre plus simple à relever et s'avère être très représentatif des performances des animaux. Néanmoins, certains auteurs ne relèvent pas précisément cette donnée, considérant que la réponse de l'animal doit être rapide voire immédiate (Castellano et Oliverio 1976, Sykes et Cheyne 1976, Fox 1965). De plus, dans certaines études, aucun temps limite n'est mentionné alors que dans d'autres un délai est fixé pour chaque test, indiquant qu'un animal qui ne réussit pas l'épreuve durant le temps imparti est en échec (Altman et Sudarshan 1975, Bignall 1974).

Les animaux n'étant pas tous capables de réussir un test à un âge donné, un âge moyen de réussite est souvent calculé pour chaque test. Compte tenu des critères de réussite établis pour chaque épreuve,

un pourcentage de réussite est calculé chaque jour pour chacun des groupes (Bignall 1974, Fox 1965). Ces pourcentages étant croissants au cours du temps, l'âge moyen de réussite correspond ainsi généralement au point d'inflexion de la courbe représentant les pourcentages de réussite non cumulés (Castellano et Oliverio 1976, Sykes et Cheyne 1976, Smart et Dobbing 1971a, b) (**Figure 6**).

De plus, la *qualité* d'une réponse, qui peut être quantifiée par l'attribution d'une note, relève d'appréciations subjectives des expérimentateurs malgré une standardisation des phénomènes observables (Smart et Dobbing 1971a, b, Fox 1965).

Concernant la taille de l'effectif et les individus testés, différents points de vue s'affrontent également. Smart et Dobbing (1971a, b) préconisaient de tester systématiquement un même ensemble de 20 rats, alors que Gelly (1979) recommandait d'observer, autant que possible, des animaux différents chaque jour pour éviter des phénomènes d'apprentissage (déjà possibles chez le jeune) ou des modifications comportementales liées à la manipulation des animaux. Selon les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques concernant l'étude de la neurotoxicité pour le développement (OCDE 2007), dans le cadre de l'évaluation du développement sensori-moteur, il est recommandé de tester 20 animaux par sexe (1/sexe/portée), chaque animal étant tiré au sort à chaque test. Des différences interindividuelles existant entre les animaux d'une même portée, dans notre cas il a été choisi, dans un souci de représentativité, de ne pas réduire chaque portée à la performance de deux animaux (1/sexe) mais à la moyenne des performances de tous les jeunes de la portée.

Enfin, l'heure de réalisation du test dans le cycle d'activité de l'animal, l'ambiance lumineuse et la température de la pièce d'expérimentation, ainsi que le temps de séparation entre la mère et les jeunes lorsque ceux-ci sont testés (ou lorsque la mère est soumise à l'exposition), sont des facteurs susceptibles d'influencer la réponse des animaux lors du test.

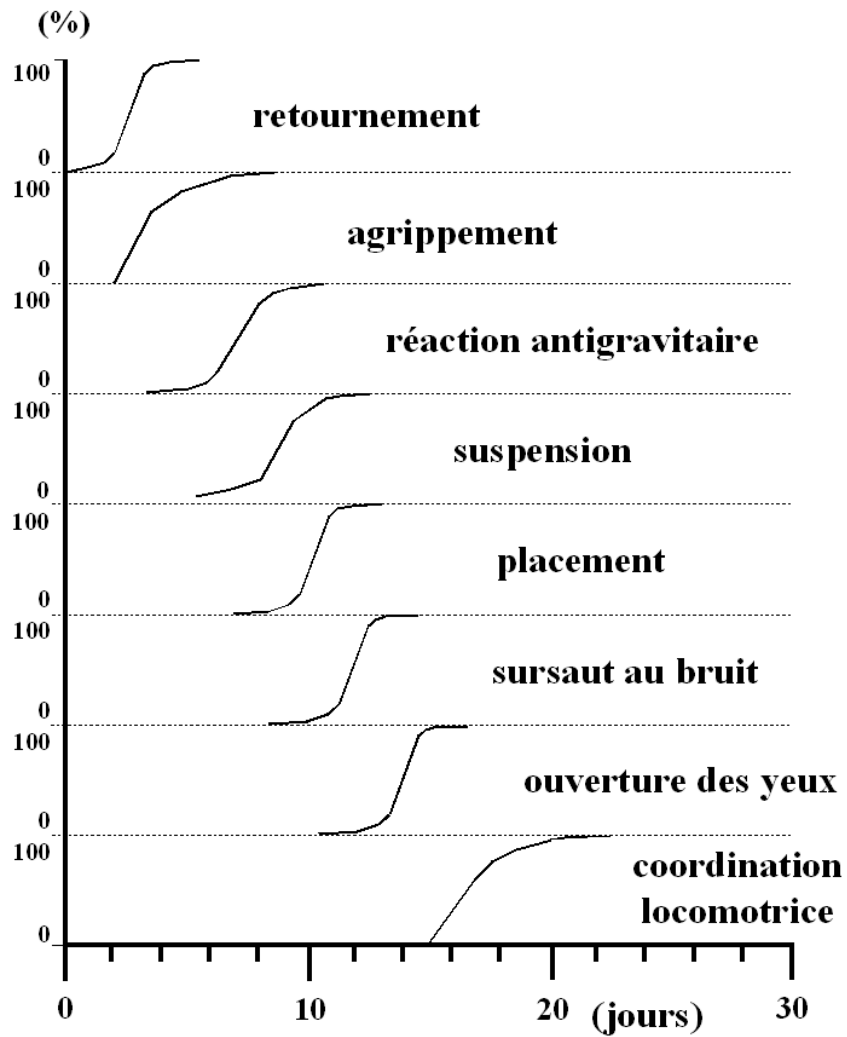


Figure 6 : Echelle d'évaluation du développement neuromoteur chez le rat (D'après Gelly 1979)

III. Procédure des tests

III.1. Tests du développement sensori-moteur

Dans l'échelle de développement établie par Gelly (1979), a été considéré un temps limité pour la réalisation de chaque épreuve. Compte tenu de ce critère, il a été déterminé un âge moyen de réussite pour chaque épreuve qui a été utilisé dans nos études pour positionner chaque test de développement à un âge de vie postnatale donné. Les procédures utilisées pour chaque test sont celles mentionnées par Gelly (1979) (**Tableau 11**).

Ces différents tests ont tous été réalisés dans une pièce attenante à l'animalerie, respectant le même cycle lumineux et les mêmes conditions de température et d'humidité que ceux de la salle d'élevage. Les animaux ont été quotidiennement pesés et observés suivant les procédures décrites ci-dessous. En fonction des protocoles propres à chaque test, les animaux ont été testés soit une seule fois, soit quotidiennement pendant 3 à 5 jours consécutifs. Durant l'évaluation des jeunes, la mère était, soit isolée dans une cage, soit en cours d'exposition dans les chambres d'inhalation (**Chapitre 3 : II.1.3**). Dans la mesure du possible, les jeunes ont été testés immédiatement après la séparation, celle-ci ne devant idéalement pas excéder 30 minutes.

III.1.1. Evaluation du développement locomoteur

III.1.1.1. Le réflexe de retournement

Principe. Ce réflexe, également étudié chez l'homme, est la 1^{ère} réaction testée chez le rongeur après la naissance. Il permet à l'animal, dans une situation de déséquilibre ou après une chute, de retrouver sa position quadrupède normale.

Dispositif. Le raton est testé sur une planche horizontale recouverte de feutrine (**Photo 3**).

Procédure. Chaque animal est observé du 3^{ème} au 5^{ème} jour d'âge postnatal (PN). Il est au départ déposé sur le dos sur la planche. Aucune impulsion ne doit lui être donnée, celle-ci pouvant faciliter son retournement. La durée du test est limitée à 2 minutes.

Réactions de l'animal. Initialement placé sur le dos, l'animal va alors se balancer vers la droite et vers la gauche, pour tenter de se retourner et se rétablir sur ses quatre pattes. Il arrive qu'un animal effectue un « pseudo-retournement », c'est-à-dire qu'au moment de se retourner une de ses pattes reste repliée

Tableau 11 : Résumé des caractéristiques des tests développementaux employés (D'après Gelly 1979, Altman et Sudarshan 1975)

	jour de test (PN)	aptitude(s) mesurée(s)	inconvenient(s) du test	temps moyen (s)	âge moyen (PN)
Comportement locomoteur					
Test de retournement	3 - 4 - 5	. équilibre et posture	. positionnement initial de l'animal . "pseudo-retournement"	11,8 ± 9,1	2,8 ± 1,3
Réflexe d'agrippement	4 - 5 - 6	. force et tonus musculaire	. placement initial de l'animal . plusieurs essais réalisés	-	4,1 ± 1,8
<i>Cliff avoidance</i>	5 - 6 - 7	. force musculaire . coordination des 4 membres	. plusieurs essais réalisés	15	6
Réaction anti-gravitaire	8 - 9 - 10	. coordination des membres antérieures . maturation des structures du système vestibulaire	. réflexe d'agrippement au moment du passage à l'horizontale	24,6 ± 21,1	7,3 ± 3,0
Test de suspension	10	. résistance physique . force musculaire	. réalisation du test avant ou après ouverture des yeux	12,9 ± 8,5	10
Coordination locomotrice	19 - 20 - 21	. équilibre . résistance physique . coordination des 4 membres	. temps mis avant la rencontre avec la tige filetée . les chutes fatiguent l'animal	55,3 ± 34,2	16,1 ± 0,7
Maturation sensorielle					
Test du sursaut au bruit	10 à 16	. maturation des structures auditives . ouverture du conduit auditif	-	-	11,9 ± 0,7
Ouverture des yeux	11 à 17	. maturation des structures visuelles	-	-	13,7 ± 0,9
Comportement maternel					
Construction du nid	3 - 6 - 9				
Ramassage des jeunes	4 - 7 - 10	. qualité des soins apportés aux jeunes	-	-	-

moyenne ± écart-type



Photo 3 : Test de retournement

sous son corps. Cette position le plaçant dans un équilibre relativement instable, il bascule généralement à nouveau sur le dos.

Variables mesurées. Le temps nécessaire à l'animal pour se rétablir sur ses quatre pattes est chronométré. Pour chacun des trois jours de test et pour chaque groupe un pourcentage de réussite, correspondant au rapport entre le nombre de jeunes ayant réussi le test et le nombre total d'animaux testés, est également calculé.

III.1.1.2. Réaction d'agrippement

Principe. Le but de ce test est d'évaluer le réflexe d'agrippement, ce qui permet d'estimer la force et le tonus musculaire de l'animal. Dans cette optique, un dispositif permettant de placer progressivement l'animal en déséquilibre et ainsi stimuler sa face palmaire a été mis au point par Gelly (1979).

Dispositif. Le test se compose d'un plateau grillagé (15×9 cm, maillage : 5 mm) fixé à l'axe d'un moteur, pouvant effectuer un tour complet en 45 s. Un index, placé derrière le plateau mobile, permet de situer sa position par rapport à la verticale à tout moment de la rotation. Un matelas de coton est également placé sous le dispositif pour amortir les chutes des animaux (**Photo 4**).

Procédure. L'ensemble des jeunes est testé de PN4 à PN6. Chaque animal est au départ placé sur le plateau en position horizontale. Le moteur est alors actionné, ce qui entraîne la rotation du plateau et le glissement de l'animal avec pour conséquence le déclenchement de la réaction d'agrippement au grillage qui permet d'éviter la chute. Le test s'arrête lorsque l'animal ne parvient plus à rester agripper et tombe du plateau.

Variables mesurées. La performance de l'animal est estimée par l'angle atteint avant la chute. Le jeune rat réussit le test lorsque il parvient à rester agripper au minimum jusqu'au 1^{er} passage du plateau à la verticale, soit un angle de 90°. Le pourcentage de réussite à ce test est calculé compte tenu de ce critère.

Gelly a testé ce réflexe quotidiennement au cours de trois essais consécutifs. Des biais liés à cette répétition sont alors apparus dans les résultats. En effet, au moment du positionnement de l'animal sur le plateau, ses pattes antérieures ne se placent pas toujours de la même manière par rapport au grillage. Dans certains cas, l'agrippement peut ainsi être facilité. De plus, la répétition fait naître un processus d'acquisition chez l'animal qui, ayant fait l'expérience de la chute au 1^{er} essai, va au 2^{ème} et 3^{ème} passage chercher à s'agripper pour échapper à la chute.

Les animaux qui ne sont testés qu'au cours d'un seul essai, sont au début de l'épreuve positionnés de manière aléatoire. La stimulation dépendant du positionnement des pattes antérieures sur le grillage est ainsi variable entre les animaux. Ce test mettant en jeu la force musculaire, soumettre l'animal à plusieurs essais peut le fatiguer et diminuer ses performances.



Photo 4 : Réflexe d'agrippement

III.1.1.3. Cliff avoidance

Principe. Ce test, qui signifie littéralement « l'évitement de la falaise », permet d'évaluer la réaction d'évitement de l'animal par rapport au vide. Ce réflexe met en jeu la force musculaire et la coordination des membres antérieurs et postérieurs du jeune rat.

Dispositif. Le matériel utilisé pour déclencher cette réaction se compose d'un pavé de bois (L : 20 cm, l : 10 cm, h : 10 cm) et d'un matelas de coton destiné à réceptionner l'animal en cas de chute (**Photo 5**).

Procédure. Ce test est réalisé de PN5 à PN7. L'animal est au départ placé au bord du pavé, la tête et les pattes antérieures dans le vide. L'appréhension de la chute le pousse alors à tenter de s'éloigner du bord, soit en reculant, soit en effectuant une rotation vers la droite ou vers la gauche pour tenter de se rétablir entièrement sur le bloc de bois. Chaque animal est testé au cours de deux essais consécutifs, chacun étant limité à 2 minutes. Un animal qui ne réussit pas à se rétablir entièrement sur la surface du pavé est considéré en échec.

Variables mesurées. Le temps mis par l'animal pour se retrouver intégralement sur le bloc (la tête et les quatre pattes) est chronométré. Chaque jour, seule la meilleure performance est conservée en vue de l'analyse des données. Un pourcentage de réussite est également calculé pour chaque groupe pour chacun des trois jours de test.

III.1.1.4. Réaction anti-gravitaire

Principe. Cette épreuve d'orientation dans l'espace permet d'évaluer une réaction motrice impliquant la coordination des pattes antérieures et la maturation de structures du système vestibulaire chez l'animal.

Dispositif. Une planche (45×40 cm), inclinée de 20° par rapport à l'horizontale et recouverte de feutrine pour éviter que l'animal ne glisse, est utilisée pour ce test (**Photo 6**).

Procédure. Les animaux sont soumis à cette épreuve de PN8 à PN10. Au départ, chaque rat est placé la tête dirigée vers le bas sur le plan incliné. Il entreprend alors par des mouvements de rotation, initiés à partir de la tête, de se rétablir normalement dans l'espace, c'est-à-dire la tête dirigée vers le haut. Le passage à l'horizontale (rotation de 90°) constitue pour le jeune rat le moment de déséquilibre maximum, où tout son poids repose sur la patte antérieure la plus basse. L'animal réussit ce test lorsqu'il effectue une rotation de 180° par rapport à sa position initiale, la durée du test étant fixée à 2 minutes.

Variables mesurées. Le temps mis par l'animal pour effectuer un demi-tour complet est chronométré. Le pourcentage de réussite au test est également calculé quotidiennement pour chacun des groupes.



Photo 5 : *Cliff avoidance*



Photo 6 : Réaction anti-gravitaire

D'importantes variations ont été notées dans la littérature quand au choix de l'angle d'inclinaison et du critère de réussite à ce test (Altman et Sudarshan 1975, Murai *et al.* 1975, Grota et Ambruso 1973, Smart et Dobbing 1971a, b, Crozier et Pincus 1926). Ainsi, l'angle d'inclinaison de la planche est un paramètre fondamental. Plus il est important, plus le passage à l'horizontale est difficile pour l'animal, avec pour conséquence de transformer le test en une épreuve d'agrippement. Le réflexe observé n'est alors plus celui qui devait initialement être testé.

III.1.1.5. Test de suspension

Principe. Dans les présentes études, ce test est uniquement considéré comme une épreuve de résistance physique. En effet, lorsqu'il est effectué avant PN16, alors que les animaux sont encore aveugles, seule la force musculaire influence la performance des jeunes rats. En revanche, lorsqu'ils ont les yeux ouverts, ils sont capables de percevoir leur environnement et ainsi de juger du danger que représente la chute. Les animaux peuvent alors choisir de se laisser tomber s'ils considèrent que la chute n'est pas dangereuse ou tenter de rester suspendus le plus longtemps possible pour l'éviter.

Dispositif. Un fil de fer (diamètre : 0,5 mm) est tendu entre les deux montants d'un châssis (l : 40 cm) à 20 cm du sol (**Photo 7**). De même que dans certains autres tests, un matelas de coton est placé sur le plancher du dispositif pour amortir les chutes des animaux.

Procédure. Les animaux sont testés uniquement à PN10. Pour cela, ils sont amenés à saisir le fil métallique par leurs pattes antérieures. Une réaction d'agrippement a immédiatement lieu au contact du fil. Le test débute lorsque le rat a correctement saisi le fil avec les deux pattes antérieures et ne s'arrête que lorsqu'il chute.

Variables mesurées. Le temps durant lequel l'animal reste suspendu au fil est chronométré.

Le temps moyen de suspension observé par Gelly (1979) est de 10 s à PN12. Jusqu'à PN20, les animaux ne cessent d'améliorer leurs performances. Néanmoins, de PN20 à PN24, Gelly a observé que les performances des animaux diminuaient, le poids corporel commençant alors à constituer une variable d'ajustement à ce test.

Au cours de ses études, Gelly a aussi testé différentes configurations de test et différents critères de réussite par ordre de difficulté croissante. Il a analysé les performances des animaux suivant que le temps de suspension était supérieur ou égal à 10 et 30 s, en plaçant le fil à 50 cm du sol. Il a également testé l'influence de la vision sur les réactions des animaux. Pour cela, les animaux ont été soumis à PN16 à deux hauteurs de test, 20 et 50 cm. Il a observé qu'à une hauteur de 20 cm, le pourcentage d'animaux restant suspendus pendant 30 s était inférieur à celui des rats suspendus à 50 cm, montrant que les animaux, lorsqu'ils peuvent estimer l'importance de la chute et juger qu'elle représente une



Photo 7 : Test de suspension

expérience aversive, sont capables de résister plus longtemps. Ce test ne s'interprète donc pas de la même manière suivant qu'il est réalisé chez des animaux encore aveugles, où seule la force musculaire détermine leurs performances, ou après l'ouverture des yeux, où l'émotivité joue également un rôle important.

III.1.1.6. Test de coordination locomotrice

Principe. Ce test réalisé juste avant le sevrage des animaux, constitue une épreuve motrice complexe. Décomposé en plusieurs étapes, il permet de confronter le jeune rat à différents exercices nécessitant un bon sens de l'équilibre, une coordination des quatre membres et un effort physique important. Suscitant une grande dépense d'énergie, la fatigue provoquée par l'épreuve peut contribuer à diminuer les performances des animaux au cours du test, en particulier si elle se prolonge.

Dispositif. Le test se compose d'un récipient cylindrique (h : 50 cm, diamètre : 25 cm) rempli d'eau jusqu'à mi-hauteur. Une tige filetée (diamètre : 8 mm), plongée dans l'eau, émerge du centre de la cuve. A 35 cm au-dessus du niveau de l'eau, une plate-forme est fixée sur la tige filetée (**Photo 8**).

Procédure. Ce test est réalisé quotidiennement de PN19 à PN21. Au départ, l'animal est déposé dans l'eau. En nageant, il va trouver la tige filetée, s'y accrocher et l'escalader jusqu'à atteindre la plate-forme, où il va pouvoir se reposer. Généralement, seuls les rats qui utilisent leurs quatre pattes de manière coordonnée réussissent ce test. L'animal peut chuter au cours de l'ascension, s'il n'arrive pas à s'agripper correctement à la tige. La plupart des rats entreprennent alors un nouvel essai, la mise à l'eau constituant pour eux une situation aversive. Un autre risque de chute existe lors de la transition entre la tige filetée et la plate-forme qui nécessite une bonne coordination entre les pattes avant et arrières. L'animal réussit ce test lorsqu'il est complètement rétabli sur la plate-forme. La durée de l'épreuve est limitée à 4 minutes.

Variables mesurées. L'épreuve se décompose en trois étapes, chacune d'entre elles étant chronométrée :

- *temps de nage* : cumul du temps passé dans l'eau,
- *temps de grimpe* : cumul du temps d'escalade de la tige, depuis le moment où l'animal s'y accroche dans l'eau jusqu'à ce qu'il arrive au niveau de la plate-forme,
- *temps de rétablissement sur la plate-forme* : temps mis par l'animal pour se rétablir sur la plate-forme, à partir du moment où il est en haut de la tige.

Le nombre de chutes éventuelles est également relevé. Du fait qu'un animal qui chute au cours du test peut être amené à effectuer plusieurs ascensions, les temps de nage et d'escalade de la tige de ses différentes tentatives sont cumulés. Toutefois, d'importantes différences dans le temps de nage peuvent

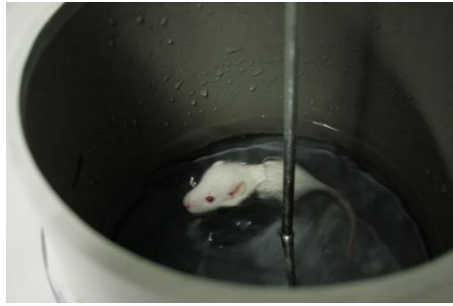


Photo 8 : Coordination locomotrice

être observées entre les animaux, la rencontre avec la tige étant relativement hasardeuse au 1^{er} essai. Un pourcentage de réussite est également calculé pour chaque groupe lors des trois jours de test.

III.1.1.7. Open-field

Principe. Le test de l'open-field, mis au point par Hall et Ballechey (1932) permet d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire de l'animal et renseigne sur son niveau d'anxiété.

Dispositif. Il est composé d'une enceinte circulaire entourée d'une paroi (h = 40 cm, diamètre = 50 cm) dont le fond est divisé en trois zones concentriques quadrillées : une couronne périphérique (ZP) composée de 12 cases, une couronne intermédiaire (ZI) constituée de 8 cases et une couronne centrale (ZC) de 2 cases. Ces deux dernières forment ce qui est considéré comme l'espace ouvert du labyrinthe (**Photo 9**).

Procédure. Au début du test, le rat est placé au centre du labyrinthe et est laissé libre de l'explorer pendant 5 minutes.

Variables mesurées. Le temps passé et le nombre de cases traversées dans chaque couronne ont été relevés. Le nombre de redressements effectués au cours du test a également été comptabilisé. En particulier, les redressements effectués avec appui sur la paroi dans la ZP ont été distingués de ceux réalisés sans appui dans l'espace ouvert.

Le niveau d'activité de l'animal est mesuré par le nombre total de cases traversées qui est un indicateur de la distance parcourue au cours des 5 minutes de test. L'anxiété est évaluée par le temps passé et le nombre de cases traversées dans les différentes couronnes. Du fait qu'elle est délimitée par la paroi du test, la couronne périphérique représente une zone plus sûre pour l'animal par opposition aux couronnes intermédiaire et centrale qui constituent une zone découverte où l'animal est davantage exposé, et donc plus anxiogène.



Photo 9 : Open-field pour jeune rat

III.1.2. Evaluation de la maturation des systèmes sensoriels

III.1.2.1. Test du sursaut au bruit

Principe. Une réaction positive d'un animal à une stimulation sonore témoigne de la maturation des structures auditives et de l'ouverture du conduit auditif.

Procédure. A partir de PN10, un son bref et de forte intensité est produit à proximité de chaque animal. Lorsque celui-ci perçoit la stimulation sonore, il effectue un sursaut. Chaque animal est ainsi testé jusqu'au jour où il réagit positivement.

Variables mesurées. Le jour où un animal réagit à la stimulation sonore, une note de 1 lui est attribuée.

III.1.2.2. Ouverture des yeux

Principe. Cet indice de développement est particulièrement simple à mesurer puisqu'il se détermine par l'observation de l'ouverture des yeux.

Procédure. Chaque animal est observé quotidiennement à partir de PN11, jusqu'à ce qu'il ait complètement ouvert les deux yeux, généralement jusqu'à PN17 (**Photo 10**).

Variables mesurées. Le jour où un animal a les deux yeux complètement ouverts, une note de 1 lui est attribuée. Dans la plupart des cas, un délai d'un jour est observé entre l'ouverture des deux yeux.

Certains auteurs ont observé que la taille de la portée pouvait influencer la date d'ouverture des yeux. Ainsi, Castellano et Oliverio (1976) ont observé que les jeunes issus de grandes portées sont susceptibles d'ouvrir les yeux plus tardivement que ceux de plus petites portées, du fait d'une croissance ralentie. A l'inverse, Gelly (1979) estime que les jeunes issus de grandes portées développent des aptitudes qui contribueraient à une maturation plus précoce de cet indice du développement.



Photo 10 : Observation de l'ouverture des yeux

III.2. Evaluation du comportement maternel

Le rat étant une espèce dont le développement cérébral est essentiellement postnatal, le jeune est à la naissance immature et totalement dépendant de sa mère. Au-delà de l'apport alimentaire via l'allaitement, la mère doit au cours des 1^{ers} jours de vie apporter aux jeunes tous les soins et la protection nécessaire à leur survie, ceux-ci étant prédominants dans la détermination des fonctions émotionnelles et cognitives chez l'homme et l'animal (Peters 1988, Power et Moore 1986). Chez le rongeur, une des activités principales de la mère est le regroupement de ses jeunes au sein d'une construction, appelée « nid », remplissant cette fonction de protection face aux hostilités du milieu. Le comportement maternel peut être appréhendé par la qualité du nid construit, l'observation de la présence et de l'activité de la mère au sein de cette structure, ainsi que sa capacité à rassembler dans le nid les jeunes dispersés dans la cage. Ces mesures permettent ainsi de révéler d'éventuelles perturbations dans le comportement maternel, lesquelles sont susceptibles de contribuer aux différences observées chez les jeunes (Deviterne *et al.* 1990). Deux tests sont ainsi réalisés au cours des dix premiers jours de vie postnatale, période durant laquelle le comportement maternel est exacerbé du fait de l'absence d'autonomie des jeunes.

III.2.1. Construction du nid

Principe. Ce test permet d'estimer la qualité des soins apportés aux jeunes. L'observation de la construction du nid constitue en cela un bon indicateur de la disposition des mères.

Procédure. Le comportement des mères est testé à PN3, PN6 et PN9. Un carré de coton compressé est déposé dans la cage d'habitation fournissant à la femelle un matériau qu'elle va pouvoir utiliser pour construire le nid en plus de la sciure. La femelle va ainsi le déchiqueter et utiliser les copeaux pour constituer un nid. La mise à disposition de ce matériau va permettre d'évaluer l'avancement de la construction du nid qui est observé 1 heure, 2 heures et 24 heures après le début du test.

Variables mesurées. A chaque phase d'observation, une note de 1 est attribuée si le matériau a entièrement été utilisé pour la construction d'un nid et de 0 si celui-ci n'a pas été déchiqueté (**Photo 11**).

III.2.2. Ramassage des jeunes

Principe. Ce test, adapté des travaux de Deviterne et Desor (1990), a pour but d'évaluer chez la mère le comportement de rassemblement des jeunes au sein du nid.

Procédure. Le test est réalisé à PN4, PN7 et PN10. Il consiste à observer durant 20 minutes le comportement de la mère vis-à-vis de ses jeunes dans leur cage d'habitation. Au départ, la mère est



Photo 11 : Construction du nid

retirée de la cage, les jeunes sont éparpillés à l'intérieur de la boîte et le nid initialement formé dans la sciure est défait. Les séances de test sont filmées et enregistrées pour permettre le relevé ultérieur des différents comportements.

Variables mesurées. Quatre variables sont mesurées :

- *temps de 1^{er} ramassage* : correspond au temps mis par la mère pour saisir un 1^{er} jeune,
- *temps total de rassemblement* : correspond au temps mis par la mère pour regrouper tous les jeunes en un même endroit,
- *temps consacré aux jeunes* : correspond au temps total que la mère consacre à ses jeunes durant la période d'observation (regroupe le temps mis pour rassembler tous les jeunes et les périodes d'allaitement et de toilettage des rats, par opposition au temps qu'elle consacre à s'alimenter, à sa propre toilette et à l'exploration de son environnement),
- *qualité du nid reconstruit* : correspond à une appréciation donnée au nid reconstruit par la rate (0 : absence de nid, 1 : nid reconstruit).

III.3. Tests à l'âge adulte

III.3.1. Labyrinthe en croix surélevé

Principe. Le labyrinthe en croix surélevé (LCS), défini par Handley et Mithani (1984) et validé par Pellow *et al.* (1985), permet d'évaluer le niveau d'anxiété et l'activité locomotrice chez le rat et la souris.

Dispositif. Il est constitué de quatre branches surélevées à 70 cm du sol : deux branches appelées « branches fermées » (BF) (50×10×50 cm) pourvues de parois verticales opaques et deux branches dites « branches ouvertes » (BO) (10×50 cm) non cloisonnées et ouvertes sur le vide. Ces quatre branches sont disposées de manière à former une croix dont l'intersection est appelée « zone centrale » (ZC) (10×10 cm). Les BO sont pourvues d'un rebord de 2 mm qui a pour but de permettre à l'animal de s'agripper et d'éviter de chuter (**Photo 12**).

Procédure. Au début du test, l'animal est placé dans la ZC, la tête orientée vers une BO. Il est alors laissé libre d'explorer le labyrinthe pendant 5 minutes.

Variables mesurées. Deux types de variables ont été relevés dans ce test :

- *des variables spatio-temporelles* :
 - nombre total de branches visitées, nombre d'entrées dans chaque type de branches et nombre de passages par la ZC,
 - temps passé dans chaque type de branche et dans la ZC,



Photo 12 : Labyrinthe en croix surélevé

- et des variables éthologiques relatives à l'exploration verticale du labyrinthe :
 - nombre de redressements (l'animal se dresse en position verticale, en appui sur ses membres postérieurs),
 - nombre de *head-dipping* (l'animal se penche et passe sa tête par dessus le rebord d'une BO),
 - nombre d'étirements (l'animal allonge son corps en avançant ses membres antérieurs sans déplacer ses membres postérieurs, puis revient à sa position initiale).

Pour chacune de ces trois variables, la zone dans laquelle se situait l'animal au moment de l'observation du comportement a de plus été précisée.

Dans le LCS, le rat est soumis à un environnement composé d'espaces clos (les deux BF) correspondant à des zones de refuge, et d'espaces découverts (les deux BO) constituant un milieu anxigène pour l'animal (Treit *et al.* 1993). Ces deux zones sont reliées par la ZC, qui représente une zone de décision pour l'animal, hésitant entre son besoin d'exploration de l'espace environnant et son aversion pour les espaces découverts. Les BF et la ZC forment ainsi la zone protégée du labyrinthe. Plus l'animal va explorer les BO, moins il sera considéré comme anxieux. En parallèle, le nombre total de branches visitées, de redressements et de *head dipping* réalisés au cours du test renseignent sur le niveau d'activité de l'animal.

III.3.2. Open-field

Ce test, similaire à celui qui est utilisé pour l'expertise de l'activité comportementale chez le jeune rat, a également été réalisé chez l'adulte. Les dimensions sont toutefois adaptées à la taille de l'animal adulte (h = 45 cm diamètre = 1 m). Le fond est de la même manière quadrillé selon trois zones concentriques : la couronne périphérique étant composée de 16 cases, la couronne intermédiaire de 9 cases et la couronne centrale de 4 cases (**Photo 13**).

Concernant l'évaluation de l'anxiété, le test de l'OF se distingue du LCS par la qualité de l'environnement aversif recréé. En effet, les BO du LCS représentent un espace beaucoup plus anxigène pour l'animal que l'espace découvert de l'OF comparé aux zones de refuges propres à chacun des deux tests. La configuration du LCS, plus contraignante que celle de l'OF, implique une disparité dans la mesure du niveau d'anxiété de l'animal, où l'OF permet de détecter de manière plus sensible de faibles variations (Carola *et al.* 2002).

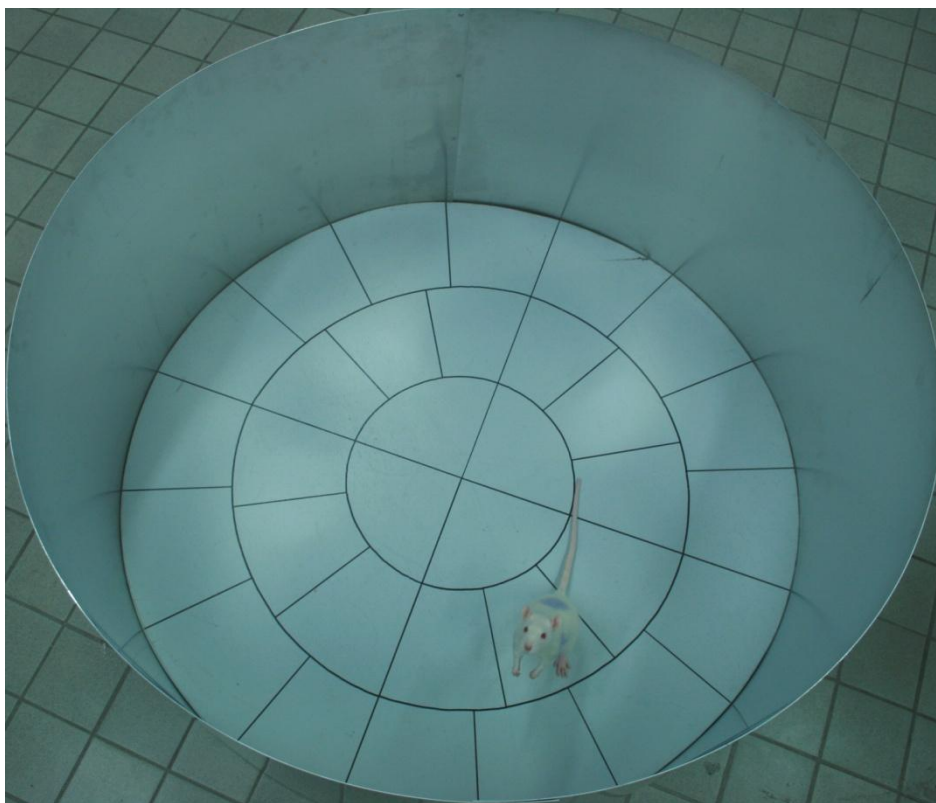


Photo 13 : Open-field chez l'adulte

III.3.3. Boîte claire/obscur

Principe. Ce test, adapté du dispositif mis au point par Crawley et Goodwin (1980), est destiné à évaluer le niveau d'anxiété chez l'animal, en le confrontant à un espace aversif et à un milieu plus sécurisant de manière analogue aux tests du LCS et de l'OF.

Dispositif. La boîte claire/obscur (BCO) est constituée de deux enceintes, l'une carrée (30×30 cm) peinte en noire et fermée sur le dessus par une planche de bois et est appelée « compartiment sombre (CS) » et l'autre rectangulaire (50×30 cm) ouverte sur le dessus et éclairée par une lumière blanche d'intensité 60 lux, appelée « compartiment clair (CC) ». Les deux compartiments communiquent entre eux par une ouverture (**Photo 14**). Du fait du cloisonnement du CS, seul le comportement de l'animal dans le CC est observable et quantifiable.

Procédure. Le déroulement du test est décomposé en plusieurs phases :

- *phase 1* : l'animal est déposé dans le CC, la tête faisant face au mur opposé à l'entrée dans le CS. Le test ne débute que lorsque l'animal entre le CS. A partir de ce moment, le comportement de l'animal est observé durant 5 minutes,
- *phase 2* : elle correspond au temps mis par l'animal pour passer du CS au CC pour la 1^{ère} fois,
- *phase 3* : elle débute à l'issue de la 1^{ère} entrée de l'animal dans le CC.

La durée de chaque passage est variable, dans la mesure où la latence d'entrée dans le CS, qui dépend du comportement de chaque animal, s'ajoute aux 5 minutes de test.

Variables mesurées. La latence d'entrée dans le CC, le temps passé dans chacun des compartiments et le nombre de tentatives d'entrées dans le CC sont relevés pour rendre compte du niveau d'anxiété de l'animal. Le nombre de transitions entre les deux compartiments et le nombre de redressements renseignent plus spécifiquement sur l'activité locomotrice et exploratoire des animaux testés.

De manière générale, les animaux passent plus de temps dans le CS que dans le CC, considéré comme milieu aversif. De plus, le nombre de transitions réalisées par l'animal entre les deux compartiments est généralement faible (Crawley 1985, Crawley et Goodwin 1980). L'administration de substances anxiolytiques a montré chez des animaux traités une augmentation du nombre d'alternances entre les deux compartiments, une diminution de la latence de 1^{ère} entrée dans le CS, ainsi que du temps passé et de l'activité exploratoire dans le CC (Kilfoil *et al.* 1989, Crawley 1981).



Photo 14 : Boîte claire/obscur

III.3.4. Labyrinthe en Y

Principe. Le test du labyrinthe en Y (LY), initié par Tolman (1924), permet de mesurer la capacité d'alternance spontanée, soit la mémoire immédiate et à court terme, chez le rongeur.

Dispositif. Il est constitué de trois branches (60×10×45 cm) surmontées de cloisons verticales et positionnées en Y. Chaque branche est identifiée par une lettre : A, B ou C, permettant ainsi de relever la succession des différentes branches visitées (**Photo 15**).

Procédure. Au début du test, l'animal est placé au fond de la branche A. Il est alors laissé libre d'explorer le labyrinthe pendant 10 minutes.

Variables mesurées. Chaque entrée dans une branche a été relevée pour rendre compte de l'enchaînement des différentes branches visitées au cours du test. A partir de cette séquence, on définit le nombre de triplets justes réalisés, sachant qu'un triplet juste correspond à l'enchaînement de 3 branches différentes. La capacité d'alternance des animaux correspond alors au rapport entre le nombre de triplets justes et le nombre total de triplets réalisés (défini par le calcul suivant : $(\text{nombre total de branches visitées} - 2) \times 100$). De plus, les relevés du nombre total de branches visitées, du nombre de branches visitées au cours de la 1^{ère} minute et du nombre de redressements effectués renseignent sur le niveau d'activité de l'animal.

III.3.5. Labyrinthe radial à 8 branches

Principe. Ce test, mis au point par Olton et Samuelson (1976), permet d'évaluer les capacités d'apprentissage spatial et de mémorisation à court et à long terme chez le rongeur.

Dispositif. Le labyrinthe se compose de 8 branches cloisonnées (60×10×10 cm) qui se rejoignent au niveau d'une zone centrale circulaire (diamètre : 30 cm). Des repères visuels sont disposés sur les murs de la pièce pour permettre à l'animal de s'orienter (**Photo 16**).

Procédure. Ce test reposant sur un renforcement alimentaire, les animaux ont préalablement à la phase d'évaluation été soumis à 7 jours de restriction de nourriture. Ils ont ensuite été familiarisés avec le labyrinthe en étant libres de l'explorer 15 minutes par jour pendant 3 jours consécutifs, chaque branche étant alors renforcée par une importante quantité de nourriture appétante (grains de riz soufflés au chocolat). Au cours de la phase de test, chacune des 8 branches est renforcée par un grain de riz soufflé avant chaque passage. Pour le test, le rat est isolé dans la zone centrale durant 1 minute puis est laissé libre d'explorer le labyrinthe. Le test est réalisé tous les jours durant 5 à 12 jours consécutifs à raison d'un passage par animal chaque jour.

Variables mesurées. Le critère de réussite à ce test est la visite des 8 branches du labyrinthe. Néanmoins, si après 15 minutes passées dans le labyrinthe, un animal n'a pas visité les 8 branches, le

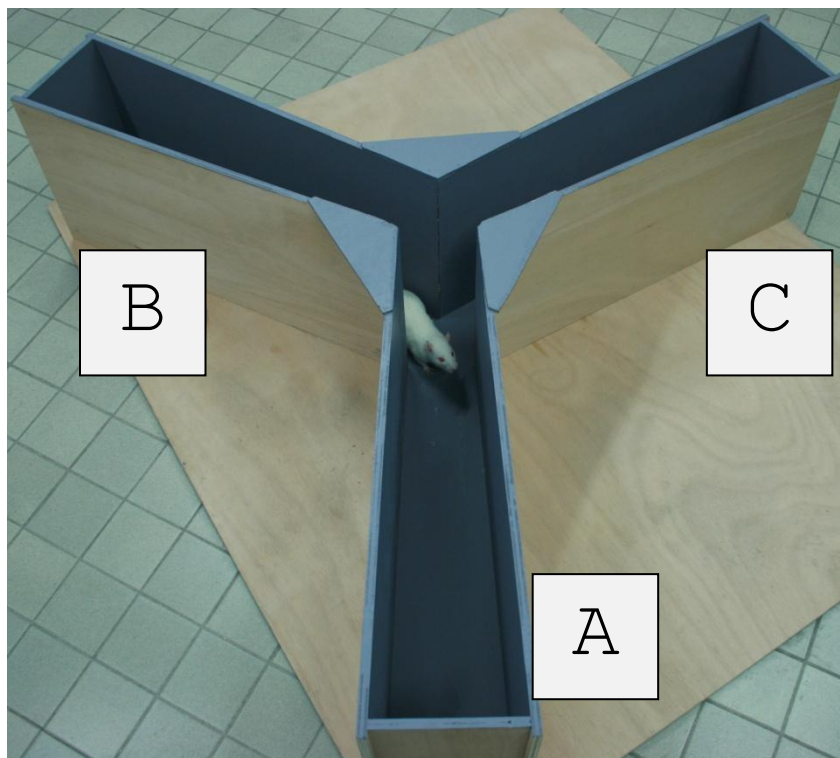


Photo 15 : Labyrinthe en Y

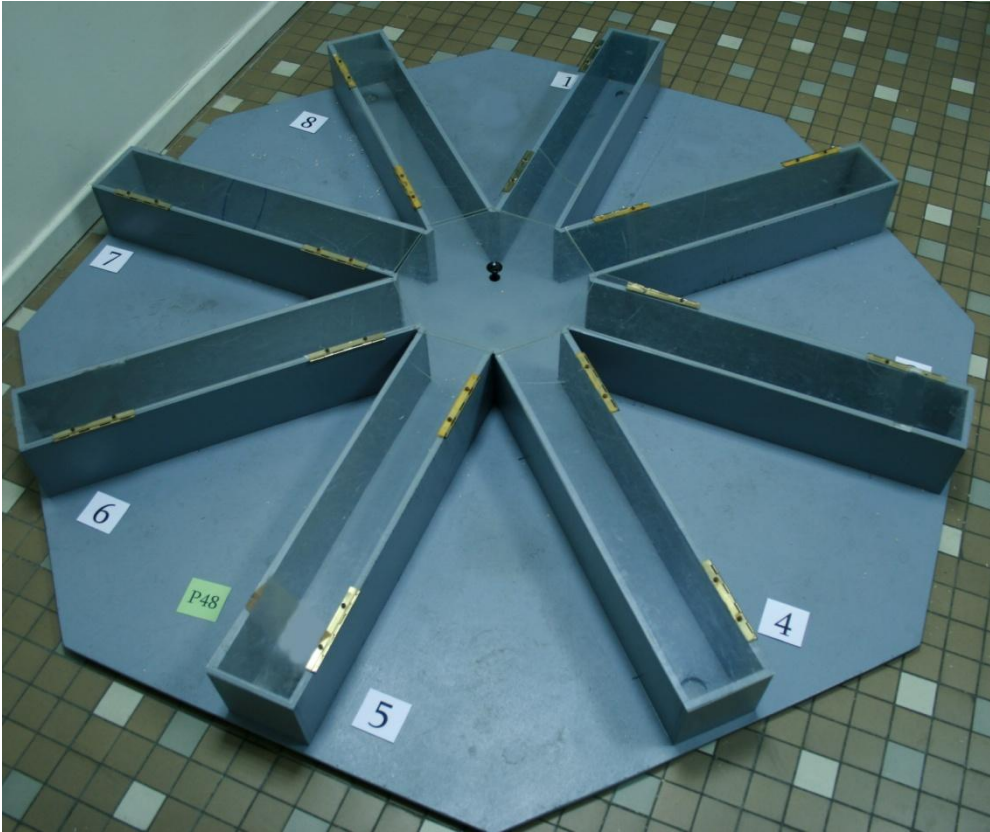


Photo 16 : Labyrinthe radial à 8 branches

test est arrêté et l'animal considéré en échec. A chaque séance de test, différentes variables sont alors relevées :

- *temps total* : correspond au temps mis par l'animal pour visiter les 8 branches du labyrinthe,
- *nombre total de branches visitées* : valeur relative au nombre de branches visitées jusqu'à la réussite au test,
- *nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur* : nombre de branches visitées avant que l'animal n'entre à nouveau dans une branche qu'il a déjà visité,
- *nombre de branches visitées par minute* : donne une indication sur la vitesse de parcours du test.

Durant la période de test, les animaux deviennent de plus en plus performants. A mesure qu'ils apprennent et mémorisent la topographie du labyrinthe, leur nombre d'erreurs diminue, ce qui leur permet de récupérer l'ensemble de la nourriture dans un minimum de temps et d'effort. Cette progression montre que les rongeurs sont capables de développer une forme d'apprentissage de l'espace dans lequel ils évoluent. Les animaux s'orientent alors dans le labyrinthe suivant des repères situés en dehors du test (Mazmanian et Roberts 1983, Suzuki *et al.* 1980) et par des indices associés à chacune des branches du labyrinthe (Kraemer *et al.* 1983).

III.3.6. Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif

Principe. Le test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif (TESLA) permet d'évaluer la mémoire de référence de l'animal.

Dispositif. Il est composé d'un box (50×40×37 cm) soumis à un éclairage de forte intensité (1200 lux) aversif pour le rat (**Photo 17**). Le dispositif est muni de deux pédales, l'une étant appelée « levier actif » car elle commande l'extinction de l'éclairage, l'autre étant appelée « levier inactif » car elle ne commande aucune action. Un appui sur le levier actif pendant la phase lumineuse est suivi d'une période d'obscurité de 30 s pendant laquelle ce levier devient inactif (des appuis cumulés n'offrent pas la possibilité de prolonger les périodes d'obscurité). Chaque cage est connectée à un système informatique d'enregistrement du nombre et de la qualité des appuis au cours des séances (Open System 1995, 1996 ; TESLA v2.4 © ETAP).

Procédure. Le test se déroule sur deux jours consécutifs. Le 1^{er} jour correspond à une phase d'habituation durant laquelle les animaux se familiarisent avec le dispositif expérimental et la règle à apprendre. Le 2^{ème} jour est relatif à la phase de test ou de rappel pendant laquelle les animaux apprennent ou réapprennent à discriminer la règle. Au départ, l'animal est placé au centre du dispositif, la tête faisant face à l'arrière de la boîte. Celle-ci est ensuite refermée par une porte en plexiglas et exposée à un éclairage de forte intensité. Chaque passation au cours des deux phases est observée

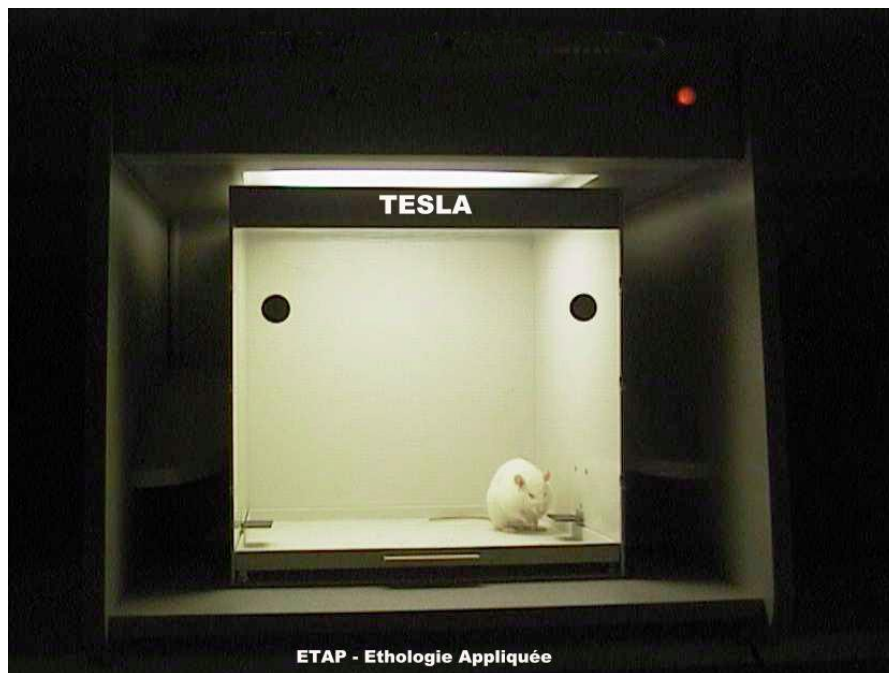


Photo 17 : Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif

pendant 20 minutes.

Variables mesurées. Au cours des phases d'habituation et de test, les nombres d'appuis réalisés sur chacune des deux pédales, en période lumineuse et en période obscure ont été relevés. A partir de ces données, des indices permettant d'évaluer les capacités d'apprentissage et de mémorisation de l'animal ont été calculés :

- *discrimination du levier actif* : capacité de l'animal à distinguer le levier actif du levier inactif,
- *discrimination de la période active* : capacité de l'animal à distinguer la période lumineuse pendant laquelle le levier est actif,
- *discrimination du levier actif et de la période active* : capacité de l'animal à distinguer le fait que le levier actif n'est actif qu'en période lumineuse et devient inactif en période obscure.

Par ailleurs, le nombre total d'appuis sur les pédales renseigne sur le niveau d'activité de l'animal.

Basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour des environnements fortement éclairés, le TESLA est un dispositif de conditionnement opérant reposant sur un renforcement négatif ayant pour stimulus l'extinction de la lumière. Ce test fait ainsi appel à trois règles d'apprentissage que le rat va devoir comprendre au hasard de ses appuis. Il doit alors successivement comprendre que seule une des deux pédales lui permet d'éteindre la lumière, puis réaliser qu'en période obscure cette pédale ne permet plus aucune action et que ses appuis ne lui permettent pas de prolonger la période d'obscurité. Ainsi, plus le nombre d'appuis sur la pédale active sera important et plus ces appuis auront lieu en période lumineuse au détriment de la période obscure, meilleures seront les capacités de discrimination et d'apprentissage de l'animal.

OBJECTIFS de la THESE

Objectifs

Le présent travail a été mené dans le cadre de la détermination des effets de l'exposition à la pollution atmosphérique. A ce jour, peu d'études se sont intéressées à l'évaluation d'effets potentiellement neurotoxiques d'expositions à des polluants ubiquitaires, persistants et avérés toxiques à de faibles niveaux de contamination. Les expérimentations qui ont été réalisées se sont ainsi basées sur les conséquences de l'exposition à un composé listé parmi les polluants à risques, particulièrement volatil et abondant dans l'air ambiant de la famille de HAP, le fluorène. Compte tenu de résultats antérieurs montrant la neurotoxicité précoce et à l'âge adulte d'autres composés de type HAP (Saunders *et al.* 2002, 2003, Bouayed *et al.* 2009a, Grova *et al.* 2007, 2008), de récentes études épidémiologiques attestant de l'impact négatif de l'exposition aux HAP sur le développement cognitif des jeunes enfants (Edwards *et al.* 2009) et des quantités non négligeables de fluorène dosées dans lait maternel (Zanieri *et al.* 2007), nous avons cherché à mettre en évidence dans un modèle animal les effets du transfert placentaire et lactationnel de cette molécule sur le développement neurocomportemental et cognitif du jeune.

Aucune donnée concernant la neurotoxicité de ce composé n'étant disponible, plusieurs études ont été réalisées dans le but de cerner la nature et l'intensité des effets pouvant être induits par ce composé chez l'animal adulte et le jeune en développement.

Dans un 1^{er} temps, trois études d'exposition de l'animal adulte au fluorène ont été réalisées. Parmi celles-ci, deux études d'administration répétée de la molécule par voie intrapéritonéale et par voie orale à de fortes doses (**Chapitre 1**) et une étude consistant en l'exposition répétée à l'inhalation du composé à des niveaux de contamination réalistes (**Chapitre 2**), ont été réalisées afin de caractériser le potentiel neurotoxique du composé.

Dans un 2^{ème} temps, deux études visant à évaluer les effets de l'exposition indirecte du jeune au fluorène sur son développement neuromoteur et comportemental ont été menées. Ces deux expérimentations ont été réalisées au regard de deux fenêtres d'importance majeure dans la maturation des fonctions cérébrales précoces, la période de gestation et la période d'allaitement. Différentes par le moment d'exposition des mères, elles avaient ainsi pour but d'évaluer d'une part les effets de l'exposition prénatale et d'autre part les effets de l'exposition postnatale via le lait maternel de l'exposition au fluorène sur la maturation des aptitudes motrices et sensorielles précoces des jeunes et

les conséquences potentiellement persistantes ou retardées survenant à l'âge adulte (*Chapitre 3*).

Des niveaux de contamination calculés sur la base d'expositions humaines ont été testés dans les différentes études d'exposition à l'inhalation du composé, pour permettre la comparaison des effets neurocomportementaux induits à différents moments de la vie de l'animal.

SECTION EXPERIMENTALE

Chapitre 1 : Toxicité neurocomportementale de l'administration répétée de 28 jours de fluorène par voie intrapéritonéale ou par voie orale chez le rat adulte

I. Objectifs

Actuellement, peu de données toxicologiques concernant le fluorène sont disponibles et aucune étude cherchant à évaluer la neurotoxicité de la molécule n'a été menée (**Section introductive : I.1.5.4.**). Aussi, pour permettre de cerner la nature potentiellement neurotoxique de ce composé, deux études préliminaires consistant à administrer la molécule par voie intrapéritonéale ou par voie orale pendant 28 jours ont été réalisées chez le rat adulte. Le but était d'établir les effets pouvant être induits d'une part lorsque la molécule est directement mise à disposition de l'organisme et d'autre part après un effet de 1^{er} passage, où elle subit des métabolisations intestinales ou hépatiques avant d'être distribuée aux autres organes.

Compte tenu de valeurs limites établies dans une étude antérieure (LOAEL = 250 mg/kg/j, NOAEL = 125 mg/kg/j ; USEPA 1989), trois doses ont été testées dans ces deux études : 1, 10 et 100 mg/kg/j. Ces niveaux de contamination, volontairement plus bas que ceux testés précédemment, ont été choisis dans le but de se rapprocher de cas d'exposition réalistes observés chez l'homme, tels qu'il en sera le cas dans les études suivantes. Le but était de définir chez l'animal adulte les composantes comportementales susceptibles d'être affectées par l'exposition au fluorène. L'analyse des concentrations cérébrales de la molécule mère et de ses métabolites devait par ailleurs permettre de déterminer la capacité du polluant à atteindre le compartiment cérébral et à être métaboliser.

II. Matériel et méthodes

II.1. Protocole expérimental

II.1.1. Animaux

Pour chacune des deux études, 32 rats mâles de souche Wistar Han d'un poids compris entre 225 et 250 g (c'est-à-dire âgés de 8 à 9 semaines au moment du traitement) et provenant de chez Harlan (Gannat, France) ont été utilisés. A leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été répartis par cage de 2 et marqués individuellement au niveau de la queue pour être identifiés tout au long de l'expérience. Avant le début du traitement, les animaux ont été stabulés à l'animalerie durant 7 jours, période pendant laquelle aucun traitement n'a été administré. Tout au long de l'expérimentation, les animaux ont été maintenus dans des conditions standards d'élevage (température : $22\pm 3^{\circ}\text{C}$; humidité : $50\pm 20\%$) sous un cycle lumineux inversé (lumière allumée de 20 à 8h) et ont reçu de la nourriture (granulés entretien rat/souris Teklad Global 2016, Harlan, Gannat, France) et de l'eau *ad libitum*. L'ensemble des manipulations et des soins apportés aux animaux a été réalisé sous une lumière rouge de faible intensité. Les procédures utilisées lors de ces études étaient en accord avec la directive européenne du 22 septembre 2010 concernant l'expérimentation animale (2010/63/UE).

II.1.2. Traitements

Le fluorène (n° CAS : 86-73-7, pureté : 98%) conditionné sous forme solide (Sigma Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) a été mis en solution dans de l'huile végétale (Isio 4, *LESIEUR*) afin d'être administré aux animaux.

Pour ces deux études, les animaux ont été traités quotidiennement pendant 28 jours aux doses de 1, 10 ou 100 mg/kg de fluorène. L'administration a été faite par voie intrapéritonéale ou par voie orale. Afin de toujours délivrer la même dose à chaque animal, le volume de solution administré était chaque jour ajusté au poids des rats, à raison de 0,5 mL/100 g de poids corporel. Les animaux témoins des deux études ont, suivant le mode d'administration employé, reçu le véhicule seul.

II.2. Analyse comportementale

Après 28 jours de traitement, le niveau d'anxiété des animaux a été évalué dans le labyrinthe en croix surélevé et dans l'open-field, les capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme dans le labyrinthe radial à 8 branches et le TESLA et l'activité générale dans l'ensemble des tests.

L'observation des animaux a été réalisée sous lumière rouge lors de la phase nocturne des animaux de manière à garantir un niveau d'activité lors du test. Chaque passation a été filmée et enregistrée pour permettre le dépouillement ultérieur des différentes variables comportementales.

Tous les rats ont été testés et observés par un même expérimentateur selon les procédures décrites précédemment (**Section méthodologique : III.3.**). A l'issue de chaque passage d'un animal dans un test, le dispositif a été nettoyé à l'aide d'une solution contenant 30% d'éthanol de manière à masquer tout indice olfactif pour le rat suivant. L'ensemble des passations a été analysé à l'aide du logiciel de relevés éthologiques *The Observer XT v8.0* (Noldus, Wageningen, Pays-Bas) selon la définition de chaque variable comportementale à quantifier.

II.3. Mesures physiologiques

Dans les deux études, le poids corporel des animaux a été relevé quotidiennement pendant la période de traitement. A l'issue des tests comportementaux, les rats ont été euthanasiés et les cerveaux et les foies disséqués et pesés.

II.4. Quantification des concentrations de fluorène et de ses métabolites au niveau cérébral

Le fluorène et trois de ses métabolites ont été dosés dans le cerveau de l'ensemble des animaux des deux études. Le but de ces dosages étant de mettre potentiellement en évidence un lien entre des troubles comportementaux et la présence du polluant et/ou de ses métabolites au niveau cérébral.

Les concentrations cérébrales du fluorène et de trois de ses métabolites, le 2-, le 3- et le 9-OH fluorène, ont été analysées suivant la méthode analytique décrite par Grova *et al.* (2011). Les cerveaux (100 mg) ont été homogénéisés avec 200 µL d'eau ultrapure, 0,1% de triton X-100 et 20 µL d'une solution à 0,1 mg/mL de fluorène- *d10* et de naphthol- *d7* (étalons internes) (MRI/NCI, Kansas City, Missouri, USA). Un tampon acétate (1 M, pH 5,6), 5 µL de sulfatase (10 unités/µL) et 5 µL de

glucuronidase (127 unités/ μL) de *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich, Bormen, Belgique) ont été ajoutés aux échantillons de cerveaux. Une hydrolyse a ensuite été réalisée en plaçant les échantillons dans une étuve à 37°C durant une nuit. Une 1^{ère} extraction liquide-liquide basée sur un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50:50, v/v) a permis l'extraction du fluorène et de ses métabolites. Le surnageant a été collecté et les solvants ont été évaporés sous flux d'azote à 37°C. Le résidu a été dissout dans le cyclohexane et appliqué sur une colonne d'extraction en phase solide Envi-Chrom P SPE (Sigma-Aldrich, Bormen, Belgique) préalablement conditionnée avec du cyclohexane. Le fluorène et ses hydroxymétabolites ont ensuite été élués avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50:50, v/v), puis évaporés. Le résidu a été dissout dans 2 mL de cyclohexane et 2 mL d'un mélange méthanol-eau (80:20, v/v). Les deux phases obtenues ont ensuite été séparées. La phase contenant le cyclohexane et le fluorène a été évaporée à sec et saponifiée : 1 mL de potasse alcoolique à 7% a été ajoutée à l'extrait, puis celui-ci a été placé dans une étuve à 60°C pendant 1 heure. Deux mL d'eau ultrapure et 2 mL d'un mélange cyclohexane/acétate d'éthyl (50:50, v/v) ont été ajoutés. La phase supérieure contenant le fluorène a été récupérée et évaporée sous flux d'azote jusqu'à obtenir 50 μL de l'échantillon. Finalement, 1 μL a été injecté en GC-MS/MS. En parallèle, la phase contenant le mélange méthanol-eau et les hydroxymétabolites du fluorène a été évaporée à sec et l'extrait a été repris dans 40 μL de réactif de dérivation [N-Methyl-(t-butyldimethylsilyl) trifluoroacétamide (MTBSTFA), 1% t-BDMCS, pureté $\geq 97\%$] (Sigma-Aldrich, Bormen, Belgique). Les analytes ont été dérivés pendant 30 min à 60°C et 2 μL ont été injectés en GC-MS/MS. La détection a été assurée par un spectromètre de masse (modèle Agilent 7000A) triple quadripôle couplé à une chromatographie en phase gazeuse (modèle Agilent 7890A) et un injecteur automatique (modèle Agilent CTC PAL). La colonne utilisée pour la séparation du fluorène et de ses métabolites était une HP-5MS (longueur : 30 m, diamètre interne : 0,25 mm, épaisseur de film : 0,25 μm). Les conditions analytiques utilisées pour la chromatographie et la détection MS/MS sont détaillées dans l'étude de Grova *et al.* (2011). Les courbes de calibration ont été réalisées en utilisant des échantillons de cerveau supplémentés par des concentrations croissantes de fluorène et de 2-, 3- et 9-OH fluorène entre 0 et 500 pg/mg de tissu cérébral. La limite de détection était de 1,9 pg/mg pour le fluorène et comprise entre 0,1 à 0,25 pg/mg pour les hydroxymétabolites. La limite de quantification a été déterminée à 6,3 pg/mg pour la molécule mère et comprise entre 0,5 et 0,8 pg/mg pour les formes hydroxylées. Le taux de recouvrement a varié entre 29 et 72% et le coefficient de détermination (R^2) a été supérieur à 0,981 pour toutes les molécules étudiées.

II.5. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyenne et d'erreur standard à la moyenne

(E.S.M.). Les effets de chaque traitement ont été analysés par une analyse de la variance (ANOVA) à 1 facteur et le test de comparaisons multiples a posteriori de Dunnett a été utilisé pour comparer les effets de chaque dose aux performances des témoins. Concernant les tests du labyrinthe radial à 8 branches et du TESLA, les résultats ont été analysés selon une ANOVA à 2 facteurs dont l'un est répété (le nombre de séances). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel de traitement statistique SPSS 16.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), le seuil de significativité étant fixé à $p = 0,05$.

III. Résultats

III.1. Etude des effets du fluorène après administration répétée par voie i.p.

III.1.1. Analyse comportementale

III.1.1.1. Labyrinthe en croix surélevé

L'ANOVA à 1 facteur a montré des variations significatives du temps passé dans la ZC du labyrinthe et du nombre de tentatives d'entrées en BO. Les comparaisons *post hoc* ont indiqué que les animaux traités à 1 et 10 mg/kg/j ont significativement passé plus de temps dans la zone centrale que les témoins (**Tableau 12**). De manière concomitante mais non significative, ces animaux ont passé moins de temps dans les BF du test (**Tableau 12**). De plus, une augmentation du nombre de tentatives d'entrées dans les BO a été observée chez les rats traités à faible dose comparé aux témoins (**Tableau 12**), révélant ainsi une baisse du niveau d'anxiété chez les animaux traités à 1 et 10 mg/kg/j, plus importante chez les rats soumis au traitement à faible dose.

III.1.1.2. Open-field

L'analyse statistique n'a révélé aucun effet de l'administration répétée de fluorène par voie *i.p.* sur l'ensemble des variables relevées dans ce test (**Tableau 13**).

Tableau 12 : Effets du fluorène après administration répétée par voie *i.p.* sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3, 27]	p
Entrées en BO	3,8 ± 0,9	3,4 ± 0,8	3,7 ± 1,1	4,3 ± 0,7	0,2	n.s.
Entrées en BF	7,5 ± 0,7	7,3 ± 0,9	7,1 ± 0,9	6,6 ± 0,6	0,2	n.s.
Nombre de passages en ZC	10,0 ± 1,0	9,7 ± 1,5	9,3 ± 0,9	9,7 ± 1,0	0,1	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	30,2 ± 7,1	29,3 ± 5,4	32,2 ± 7,8	38,5 ± 4,1	0,5	n.s.
Nombre total d'entrées	11,3 ± 1,3	10,7 ± 1,6	10,9 ± 1,1	10,9 ± 1,0	0,0	n.s.
Temps en BO (s)	60,6 ± 15,3	42,0 ± 10,2	56,4 ± 20,0	83,8 ± 21,9	1,0	n.s.
Temps en BF (s)	175,0 ± 19,5	153,0 ± 14,7	143,4 ± 18,9	138,6 ± 19,3	0,7	n.s.
Temps en ZC (s)	64,4 ± 8,9	105,0 ± 8,9 **	100,2 ± 5,5 *	73,3 ± 7,8	6,4	<0,01
Tentatives d'entrées en BO	3,4 ± 0,4	6,7 ± 0,8 *	5,9 ± 0,7	4,4 ± 0,9	3,1	<0,05
Nombre total de redressements	15,7 ± 2,1	16,1 ± 2,3	19,3 ± 1,7	16,6 ± 1,2	0,8	n.s.
Redressements en BF (%)	91,3 ± 5,7	79,6 ± 4,7	76,3 ± 5,0	82,7 ± 5,9	1,4	n.s.
Nombre total de head dipping	8,5 ± 1,8	9,4 ± 1,7	10,3 ± 2,1	11,3 ± 1,4	0,4	n.s.
Head dipping en BO (%)	41,2 ± 10,6	22,8 ± 7,7	34,0 ± 10,7	57,5 ± 5,2	2,9	n.s.
Nombre total d'étirements	8,0 ± 0,5	10,7 ± 1,7	8,1 ± 0,9	10,1 ± 1,5	1,2	n.s.
Etirements en BO (%)	47,5 ± 11,0	41,0 ± 8,7	50,1 ± 7,0	64,4 ± 10,2	1,0	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

Tableau 13 : Effets du fluorène après administration répétée par voie *i.p.* sur le comportement lié à l'activité dans l'open-field

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3,27]	p
Temps en ZC (s)	4,5 ± 3,9	8,2 ± 2,7	18,5 ± 12,9	6,7 ± 2,8	0,8	n.s.
Temps en ZI (s)	16,5 ± 7,7	25,8 ± 7,9	30,7 ± 10,6	16,2 ± 5,4	0,8	n.s.
Temps en ZP (s)	275,5 ± 10,7	259,0 ± 12,1	244,8 ± 23,0	269,5 ± 10,4	0,8	n.s.
Nombre total de cases traversées	75,3 ± 10,2	75,7 ± 15,7	77,2 ± 15,6	76,7 ± 9,9	0,0	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	3,3 ± 0,8	8,0 ± 1,5	7,0 ± 2,3	5,1 ± 1,6	1,6	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	10,1 ± 3,5	18,8 ± 5,1	15,0 ± 1,8	13,5 ± 3,0	1,0	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	86,3 ± 3,9	72,7 ± 6,6	77,5 ± 3,8	80,9 ± 4,4	1,4	n.s.
Nombre total de redressements	15,0 ± 2,2	14,2 ± 3,2	17,5 ± 3,7	16,8 ± 2,7	0,3	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

III.1.1.3. Labyrinthe radial à 8 branches

L'ANOVA à 2 facteurs a, d'une part, révélé un effet du jour de test sur le temps mis par les animaux pour visiter les 8 branches du labyrinthe et le nombre de branches visitées par minute (**Tableau 14**). En particulier, au cours des 5 jours de test, l'ensemble des animaux a mis significativement moins de temps à visiter les 8 branches du labyrinthe et a montré une tendance à l'augmentation du nombre de branches visitées par minute (**Tableau 14**). Ce facteur n'a par contre eu aucune influence sur le nombre total de branches visitées et le nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur (**Tableau 14**).

D'autre part, aucun effet du traitement au fluorène sur le comportement des animaux observé dans ce test n'a été mis en évidence par l'analyse statistique (**Tableau 14**).

De même, aucun effet d'interaction entre le groupe de traitement et le jour de test n'a été détecté (**Tableau 14**).

III.1.1.4. Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif

L'analyse statistique des données a révélé un effet du traitement au fluorène sur le nombre total d'appuis effectué dans ce test. Une augmentation significative du nombre d'appuis a été mise en évidence chez les animaux traités à 10 mg/kg/j comparé aux témoins (**Tableau 15**). En revanche, aucune différence concernant les capacités de discrimination des leviers et de la condition d'utilisation du levier actif n'a été observée sous l'effet de ce facteur (**Tableau 15**).

Par ailleurs, une variation significative de la capacité de discrimination des périodes lumineuses et du nombre total d'appuis sur les leviers a été observée entre les deux jours de test (**Tableau 15**). L'ensemble des animaux a ainsi montré une augmentation des performances d'apprentissage concernant la distinction de la période active et une diminution du nombre total d'appuis sur les leviers entre les deux jours de test (**Tableau 15**).

Une tendance statistique traduisant un effet d'interaction entre les deux facteurs a de plus été révélée. L'analyse des données montre que les animaux traités au fluorène ont plus faiblement amélioré leur performance en terme de discrimination de la période active entre les deux jours de test (**Tableau 15**).

Tableau 14 : Effets du fluorène après administration répétée par voie *i.p.* sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches

Groupe	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour	
						F _[3, 27]	p	F _[3, 27]	p	F _[3, 27]	p
Temps total (s)											
Témoins	258,2 ± 42,6	158,0 ± 20,8	186,3 ± 29,6	173,5 ± 28,2	224,0 ± 41,9	1,9	n.s.	3,3	< 0,05	1,5	n.s.
1 mg/kg	185,3 ± 26,8	156,7 ± 11,5	231,1 ± 53,8	180,4 ± 31,1	142,1 ± 15,3						
10 mg/kg	134,9 ± 16,8	156,3 ± 19,2	139,1 ± 13,1	135,0 ± 21,1	112,1 ± 12,3						
100 mg/kg	208,6 ± 33,2	152,4 ± 25,4	240,0 ± 67,4	136,7 ± 26,1	116,6 ± 15,1						
Nombre total de branches visitées											
Témoins	14,3 ± 1,6	10,8 ± 1,2	10,2 ± 1,1	10,5 ± 1,2	11,2 ± 0,8	1,0	n.s.	1,9	n.s.	1,5	n.s.
1 mg/kg	12,1 ± 1,1	10,4 ± 0,8	11,4 ± 1,1	11,3 ± 1,0	9,9 ± 0,6						
10 mg/kg	9,6 ± 0,5	11,0 ± 1,0	9,1 ± 0,3	10,9 ± 1,4	10,1 ± 0,6						
100 mg/kg	11,4 ± 1,5	11,0 ± 0,9	12,3 ± 1,7	9,6 ± 0,5	8,7 ± 0,4						
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur											
Témoins	5,5 ± 0,8	5,0 ± 1,2	6,2 ± 0,9	5,2 ± 0,8	5,7 ± 0,4	0,9	n.s.	0,9	n.s.	0,4	n.s.
1 mg/kg	5,4 ± 0,4	5,6 ± 0,8	5,9 ± 0,8	5,4 ± 0,8	6,3 ± 0,6						
10 mg/kg	6,4 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,6	5,3 ± 0,6	5,6 ± 0,7						
100 mg/kg	6,4 ± 0,8	5,7 ± 0,7	6,1 ± 0,4	5,7 ± 0,5	7,0 ± 0,5						
Nombre de branches visitées / min											
Témoins	3,7 ± 0,6	4,3 ± 0,4	3,4 ± 0,3	3,9 ± 0,4	3,4 ± 0,5	1,4	n.s.	2,5	p=0,079	0,9	n.s.
1 mg/kg	4,2 ± 0,4	4,0 ± 0,2	3,7 ± 0,6	4,0 ± 0,4	4,4 ± 0,5						
10 mg/kg	4,7 ± 0,6	4,4 ± 0,3	4,1 ± 0,4	5,1 ± 0,5	5,6 ± 0,3						
100 mg/kg	3,8 ± 0,7	5,0 ± 0,7	3,8 ± 0,7	5,1 ± 0,9	4,9 ± 0,6						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Tableau 15 : Effets du fluorène après administration répétée par voie *i.p.* sur les capacités d'apprentissage dans le
TESLA

Groupe	Habituation	Test	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour	
			F _[3,27]	p	F _[3,27]	p	F _[3,27]	p
Discrimination du levier actif (%)								
Témoins	65,5 ± 4,5	66,1 ± 9,9						
1 mg/kg	53,8 ± 4,1	58,1 ± 9,1	1,1	n.s.	0,1	n.s.	0,4	n.s.
10 mg/kg	63,1 ± 3,8	69,8 ± 8,4						
100 mg/kg	67,3 ± 3,8	60,3 ± 8,4						
Discrimination de la période active (%)								
Témoins	49,3 ± 5,5	76,9 ± 8,1						
1 mg/kg	59,9 ± 5,0	61,0 ± 7,4	1,2	n.s.	7,3	<0,05	2,9	p=0,061
10 mg/kg	52,0 ± 4,7	51,4 ± 6,9						
100 mg/kg	46,9 ± 4,7	58,2 ± 6,9						
Discrimination du levier et de la période actifs (%)								
Témoins	65,0 ± 6,0	62,7 ± 9,2						
1 mg/kg	54,7 ± 5,5	52,8 ± 8,4	1,1	n.s.	0,4	n.s.	1,6	n.s.
10 mg/kg	57,0 ± 5,1	67,6 ± 7,8						
100 mg/kg	66,4 ± 5,1	46,4 ± 7,8						
Nombre total d'appuis								
Témoins	19,8 ± 6,7	12,8 ± 6,9						
1 mg/kg	22,1 ± 6,2	12,6 ± 6,4	3,7	<0,05	4,5	<0,05	0,7	n.s.
10 mg/kg	36,7 ± 6,2 *	37,1 ± 6,4 *						
100 mg/kg	39,4 ± 6,2	28,0 ± 6,4						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.s. : non significatif

III.1.2. Mesures physiologiques

III.1.2.1. Poids corporel

L'analyse des relevés quotidiens de poids corporel a montré un effet du traitement sur la prise de poids des animaux le jour suivant la 1^{ère} administration de fluorène (**Figure 7**). En particulier, le pourcentage de variation de la prise de poids des animaux traités à 100 mg/kg/j entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour de traitement était significativement diminué par rapport aux témoins (**Figure 7**). Les jours suivants, aucune différence n'a été détectée mais l'écart de poids induit après la 1^{ère} injection a été observé tout au long de la période d'expérimentation (**Figure 7**).

III.1.2.2. Poids des organes

Aucune modification significative du poids relatif du cerveau n'a été observée (**Tableau 16**). En revanche, une variation significative du poids relatif du foie a été mise en évidence entre les groupes, montrant un accroissement du poids relatif de cet organe chez les animaux traités à 100 mg/kg/j comparé aux témoins (**Tableau 16**).

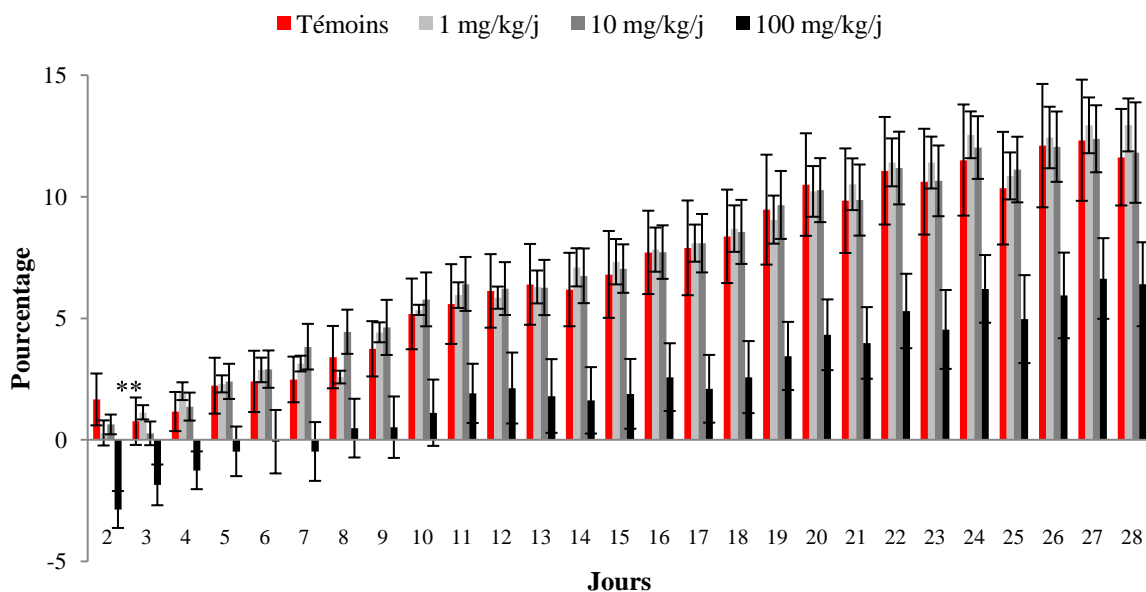
III.1.3. Quantification des concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites

L'analyse statistique des résultats de dosages cérébraux a montré une augmentation significative des concentrations de fluorène et de ses trois métabolites chez les animaux traités à 100 mg/kg/j comparé aux témoins (**Tableau 17**). Une augmentation significative de la concentration en 3-OH fluorène a également été observée chez les rats traités à 10 mg/kg/j par rapport aux animaux témoins (**Tableau 17**).

III.1.4. Conclusion

Une diminution de l'anxiété a été observée chez les animaux exposés à 1 et 10 mg/kg/j et plus particulièrement chez les animaux traités à la plus faible des deux doses. Une augmentation du niveau d'activité a également été observée chez les animaux traités à 10 mg/kg/j de fluorène. De plus, tous les animaux ont globalement amélioré leurs performances en terme d'apprentissage dans le labyrinthe radial à 8 branches et le TESLA au cours des deux tests.

Par ailleurs, une diminution de la prise de poids, une augmentation du poids du foie et des concentrations cérébrales de fluorène et de trois de ses métabolites ont significativement été mises en



Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les effets ont été étudiés par une ANOVA à 1 facteur. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

Figure 7 : Effets du fluorène après administration répétée par voie *i.p.* sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des animaux

Tableau 16 : Effets du fluorène après administration répétée par voie *i.p.* sur le poids relatif des organes (% du poids corporel)

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3,27]	p
Cerveau	0,50 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,57 ± 0,03	1,8	n.s
Foie	2,75 ± 0,14	2,72 ± 0,09	2,80 ± 0,09	3,61 ± 0,06 **	18,5	<0,01

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.s. : non significatif

Tableau 17 : Concentrations cérébrales de fluorène et de 3 de ses métabolites mono-hydroxylés après administration répétée par voie *i.p.* (ng/g de tissu)

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3,27]	p
Fluorène	24,0 ± 1,2	33,9 ± 4,1	74,4 ± 14,7	1000,4 ± 219,0 **	14,9	<0,01
9-OH fluorène	1,6 ± 0,4	3,5 ± 0,8	6,1 ± 1,1	639,0 ± 80,6 **	58,7	<0,01
3-OH fluorène	n.d.	n.d.	0,3 ± 0,1 **	0,7 ± 0,1 **	18,3	<0,01
2-OH fluorène	n.d.	1,0 ± 0,2	4,6 ± 0,7	89,0 ± 15,8 **	28,9	<0,01

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.d. : non détecté

évidence chez les animaux traités à 100 mg/kg/j.

Ces résultats montrent que des atteintes comportementales ont majoritairement été observées chez les animaux traités aux deux plus faibles doses et que des perturbations physiologiques ont plutôt été caractérisées chez les rats traités à la plus forte dose testée dans cette étude.

III.2. Etude des effets du fluorène après administration répétée par voie orale

III.2.1. Analyse comportementale

III.2.1.1. Labyrinthe en croix surélevé

L'ANOVA à 1 facteur a détecté des variations significatives du temps passé dans les BF et dans la ZC du labyrinthe (**Tableau 18**). L'analyse post hoc des différences a montré que les animaux traités à 1 mg/kg/j ont passé significativement plus de temps dans la ZC et moins de temps dans les BF comparé aux témoins (**Tableau 18**). Une augmentation non significative mais concomitante du temps passé dans les BO a également été observée chez ces animaux en comparaison des rats témoins (**Tableau 18**). Aucune différence n'a par ailleurs été observée concernant les autres variables relevées dans ce test (**Tableau 18**). Ces résultats montrent ainsi que l'administration répétée par voie orale de 1 mg/kg/j de fluorène induit une diminution du niveau d'anxiété chez les rongeurs.

III.2.1.2. Open-field

L'analyse statistique n'a révélé aucun effet du traitement au fluorène sur l'ensemble des variables relevées dans l'open-field (**Tableau 19**).

III.2.1.3. Labyrinthe radial à 8 branches

L'ANOVA à 2 facteurs a détecté une tendance statistique à un effet du traitement sur le nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur dans ce labyrinthe (**Tableau 20**). Ainsi, les animaux traités au fluorène semblent avoir commis une erreur plus rapidement que les témoins après le début du test (**Tableau 20**).

Par ailleurs, l'analyse statistique a montré un effet du jour de test sur le nombre de branches visitées par minute et le temps d'exécution du test (**Tableau 20**). Une augmentation significative du nombre de branches visitées par minute et une tendance à une diminution du temps de réussite au test a

Tableau 18 : Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3,35]	p
Entrées en BO	2,1 ± 0,4	3,0 ± 0,6	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,6	0,4	n.s.
Entrées en BF	6,0 ± 0,8	6,9 ± 0,6	7,1 ± 0,7	7,0 ± 0,7	0,5	n.s.
Nombre de passages en ZC	7,3 ± 0,8	8,8 ± 0,9	7,9 ± 1,1	8,2 ± 0,9	0,4	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	25,5 ± 4,1	29,9 ± 5,9	19,7 ± 4,9	23,0 ± 5,7	0,7	n.s.
Nombre total d'entrées	8,1 ± 1,0	9,9 ± 0,7	9,3 ± 1,2	9,3 ± 0,9	0,6	n.s.
Temps en BO (s)	33,8 ± 10,3	59,5 ± 16,2	29,8 ± 10,2	46,2 ± 15,5	1,0	n.s.
Temps en BF (s)	235,0 ± 6,5	177,3 ± 19,5 *	232,6 ± 13,3	203,4 ± 17,5	3,0	< 0,05
Temps en ZC (s)	40,4 ± 4,3	63,3 ± 5,9 **	37,67 ± 4,7	43,6 ± 4,4	5,6	< 0,01
Tentatives d'entrées en BO	3,8 ± 0,8	4,5 ± 0,7	3,67 ± 0,5	4,2 ± 0,6	0,3	n.s.
Nombre total de redressements	13,9 ± 1,3	14,8 ± 1,0	17,1 ± 1,3	12,7 ± 0,8	2,7	n.s.
Redressements en BF (%)	97,4 ± 1,3	93,5 ± 3,1	98,6 ± 0,9	96,9 ± 2,0	1,2	n.s.
Nombre total de head dipping	7,0 ± 1,6	10,6 ± 1,8	6,2 ± 1,6	8,2 ± 1,4	1,4	n.s.
Head dipping en BO (%)	33,4 ± 10,4	41,2 ± 7,7	21,4 ± 9,4	32,1 ± 9,5	0,7	n.s.
Nombre total d'étirements	8,6 ± 0,7	9,6 ± 1,3	10,1 ± 1,2	10,1 ± 0,9	0,5	n.s.
Etirements en BO (%)	36,2 ± 8,5	52,8 ± 9,4	32,6 ± 9,7	35,2 ± 10,4	0,9	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

Tableau 19 : Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur le comportement lié à l'activité dans l'open-field

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3,35]	p
Temps en ZC (s)	18,1 ± 2,8	15,0 ± 3,0	15,2 ± 2,3	20,2 ± 3,0	0,8	n.s.
Temps en ZI (s)	37,6 ± 7,7	36,3 ± 4,7	24,0 ± 2,8	25,1 ± 2,3	2,2	n.s.
Temps en ZP (s)	244,3 ± 9,3	248,8 ± 5,0	260,8 ± 3,8	254,7 ± 3,4	1,5	n.s.
Nombre total de cases traversées	119,6 ± 8,0	117,8 ± 8,9	116,3 ± 9,2	117,7 ± 9,5	0,0	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	5,4 ± 0,7	5,9 ± 0,8	5,7 ± 1,0	6,2 ± 0,9	0,2	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	14,3 ± 1,8	18,2 ± 2,8	12,8 ± 2,1	13,0 ± 1,7	1,3	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	80,2 ± 1,9	76,0 ± 3,4	81,5 ± 2,9	80,7 ± 2,4	0,8	n.s.
Nombre total de redressements	17,8 ± 1,7	16,8 ± 2,1	16,7 ± 2,5	16,7 ± 1,6	0,1	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

Tableau 20 : Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches

Groupe	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour	
						F _[3, 35]	p	F _[3, 35]	p	F _[3, 35]	p
Temps total (s)											
Témoins	158,6 ± 16,9	148,7 ± 14,6	170,9 ± 26,6	122,0 ± 7,3	113,2 ± 12,4	1,5	n.s.	2,6	p=0,074	0,8	n.s.
1 mg/kg	148,1 ± 12,7	151,6 ± 13,9	146,8 ± 23,7	149,6 ± 23,5	131,1 ± 22,2						
10 mg/kg	145,1 ± 9,5	151,7 ± 12,7	145,4 ± 18,9	130,4 ± 14,7	121,4 ± 12,3						
100 mg/kg	145,4 ± 12,7	159,4 ± 21,5	226,8 ± 60,1	175,3 ± 19,9	140,4 ± 15,8						
Nombre total de branches visitées											
Témoins	11,1 ± 0,8	10,8 ± 1,0	10,8 ± 1,1	9,7 ± 0,6	9,8 ± 0,7	0,9	n.s.	0,4	n.s.	0,8	n.s.
1 mg/kg	11,3 ± 0,7	11,3 ± 0,8	11,1 ± 0,8	11,4 ± 0,9	12,0 ± 1,8						
10 mg/kg	11,2 ± 0,5	11,1 ± 0,6	11,0 ± 1,1	10,8 ± 0,8	10,4 ± 0,9						
100 mg/kg	10,6 ± 0,8	10,0 ± 0,7	13,2 ± 2,0	12,7 ± 1,2	11,2 ± 0,9						
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur											
Témoins	6,8 ± 0,1	6,1 ± 0,6	5,7 ± 0,7	6,7 ± 0,4	6,3 ± 0,7	2,3	p=0,098	0,3	n.s.	1,9	<0,05
1 mg/kg	5,9 ± 0,5	5,4 ± 0,7	5,8 ± 0,6	5,1 ± 0,9	6,0 ± 0,5						
10 mg/kg	4,6 ± 0,4	4,9 ± 0,5	6,1 ± 0,7	5,9 ± 0,7	6,1 ± 0,6						
100 mg/kg	5,7 ± 0,5	6,1 ± 0,4	4,2 ± 0,6	4,2 ± 0,6	4,6 ± 0,8						
Nombre de branches visitées / min											
Témoins	4,5 ± 0,4	4,5 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,8 ± 0,3	5,5 ± 0,4	0,7	n.s.	7,9	<0,01	0,5	n.s.
1 mg/kg	5,7 ± 0,2	4,6 ± 0,4	4,8 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,7 ± 0,2						
10 mg/kg	4,8 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,7 ± 0,3	5,2 ± 0,4	5,3 ± 0,3						
100 mg/kg	4,6 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,2 ± 0,5	4,6 ± 0,2	5,0 ± 0,3						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

été observée chez tous les animaux au cours des 5 jours, montrant une amélioration de leurs capacités d'apprentissage (**Tableau 20**).

Une interaction entre les deux facteurs testés a également été mise en évidence concernant le nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur (**Tableau 20**). Ainsi, au cours des 5 jours de test, les animaux traités au fluorène ont moins efficacement que les témoins amélioré leurs performances d'apprentissage (**Tableau 20**).

III.2.1.4. Test d'évitement d'un stimulus lumineux aversif

L'analyse des données par l'ANOVA à 2 facteurs a montré une tendance à un effet du traitement sur le nombre total d'appuis sur les leviers (**Tableau 21**). Les animaux traités à 1 mg/kg ont sensiblement effectué plus d'appuis que les témoins sur les deux leviers (**Tableau 21**). En revanche, aucune différence concernant les capacités de discrimination des deux leviers et de la période active n'a été observée sous l'effet de ce facteur (**Tableau 21**).

Par ailleurs, l'analyse statistique a révélé un effet du jour de test sur le pourcentage de discrimination de la période active et le nombre total d'appuis (**Tableau 21**). Entre les deux jours, les animaux ont globalement amélioré leurs performances de discrimination de la période active et significativement diminué leur nombre d'appuis sur les leviers. Cette baisse d'activité est caractéristique de l'habituation des animaux au dispositif de test, ceux-ci étant généralement plus actifs lorsqu'ils sont confrontés à l'exploration de nouveaux espaces (**Tableau 21**).

III.2.2. Mesures physiologiques

III.2.2.1. Poids corporel

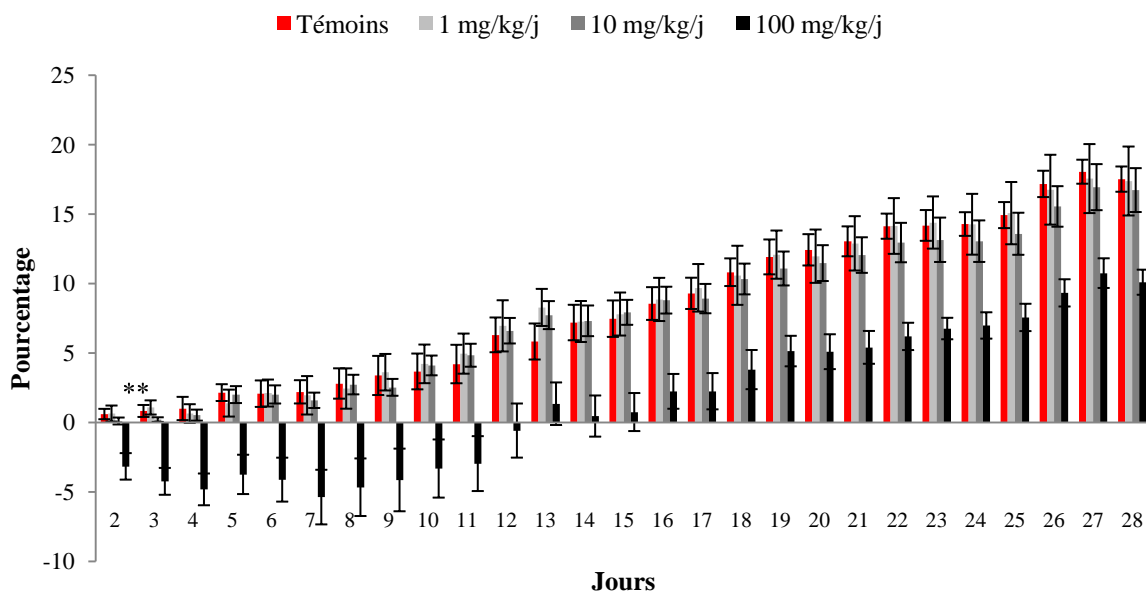
L'analyse statistique a permis de détecter un effet du traitement sur la prise de poids des animaux après la 1^{ère} administration de fluorène (**Figure 8**). Les animaux traités à 100 mg/kg/j ont significativement perdu du poids après la 1^{ère} administration, compte tenu d'une diminution significative du pourcentage de variation de la prise de poids de ces animaux comparé aux témoins (**Figure 8**). En revanche, aucune différence significative n'a plus été détectée les jours suivants. Comme dans l'étude précédente, l'écart de poids induit au début du traitement a été maintenu sur toute la période d'expérimentation (**Figure 8**).

Tableau 21 : Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur les capacités d'apprentissage dans le TESLA

Groupe	Habituation	Test	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour	
			F _[3,35]	p	F _[3,35]	p	F _[3,35]	p
Discrimination du levier actif (%)								
Témoins	31,0 ± 6,6	24,1 ± 4,8	0,3	n.s.	0,6	n.s.	2,0	n.s.
1 mg/kg	48,4 ± 7,0	35,9 ± 5,1						
10 mg/kg	52,8 ± 6,6	42,6 ± 4,8						
100 mg/kg	45,9 ± 6,6	39,9 ± 4,8						
Discrimination de la période active (%)								
Témoins	74,2 ± 3,6	68,2 ± 3,7	1,1	n.s.	5,3	<0,05	1,3	n.s.
1 mg/kg	70,9 ± 3,8	67,9 ± 3,9						
10 mg/kg	64,6 ± 3,6	74,8 ± 3,7						
100 mg/kg	64,1 ± 3,6	71,5 ± 3,7						
Discrimination du levier et de la période actifs (%)								
Témoins	48,9 ± 4,0	61,0 ± 5,6	1,6	n.s.	0,5	n.s.	1,3	n.s.
1 mg/kg	39,7 ± 4,3	56,7 ± 6,0						
10 mg/kg	44,2 ± 4,0	48,4 ± 5,6						
100 mg/kg	51,7 ± 4,0	50,5 ± 5,6						
Nombre total d'appuis								
Témoins	71,0 ± 3,6	65,7 ± 4,7	2,6	p=0,073	17,7	<0,01	0,5	n.s.
1 mg/kg	76,2 ± 3,8	69,1 ± 5,0						
10 mg/kg	69,2 ± 3,6	67,0 ± 4,7						
100 mg/kg	59,2 ± 3,6	66,2 ± 4,7						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif



Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les effets ont été étudiés par une ANOVA à 1 facteur. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

Figure 8 : Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des animaux

III.2.2.2. Poids des organes

L'ANOVA à 1 facteur a montré une tendance à l'augmentation du poids relatif du cerveau des animaux traités au fluorène, en particulier à 10 et 100 mg/kg/j, comparé aux témoins (**Tableau 22**).

Par ailleurs, une variation significative du poids relatif du foie a été observée à l'issue du traitement (**Tableau 22**). Une augmentation significative du poids relatif du foie a été observée chez les animaux des trois groupes traités au fluorène en comparaison des rats témoins (**Tableau 22**).

III.2.3. Quantification des concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites

Le traitement statistique des données a montré des variations significatives des concentrations de fluorène et de ses trois métabolites dosés au niveau cérébral entre les animaux traités au fluorène à 100 mg/kg/j et les témoins (**Tableau 23**). En particulier, des niveaux de concentration significativement plus élevés ont été mis en évidence chez ces animaux comparés aux témoins (**Tableau 23**).

III.2.4. Conclusion

L'administration répétée de fluorène par voie orale a induit une diminution du niveau d'anxiété et une augmentation de l'activité chez les animaux traités à 1 mg/kg/j. Une perturbation de la mémoire immédiate a également été observée chez les animaux traités au fluorène comparé aux témoins, mais aucune atteinte des capacités d'apprentissage à long terme et des capacités de discrimination n'a été révélée.

Au plan physiologique, une perte de poids après le 1^{er} jour de traitement et une augmentation des concentrations de fluorène et de ses trois métabolites au niveau cérébral ont, de même que dans l'étude précédente, significativement été observées chez les animaux traités à 100 mg/kg/j. Une augmentation dose-dépendante du poids du foie a par ailleurs été révélée suite à l'administration du polluant par voie orale.

Tableau 22 : Effets du fluorène après administration répétée par voie orale sur le poids relatif des organes (% du poids corporel)

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3,35]	p
Cerveau	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,55 ± 0,01	2,6	p=0,074
Foie	2,61 ± 0,03	2,81 ± 0,06 *	3,07 ± 0,05 **	3,63 ± 0,07 **	62,3	<0,01

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

Tableau 23 : Concentrations cérébrales de fluorène et de 3 de ses métabolites mono-hydroxylés après administration répétée par voie orale (ng/g de tissu)

	Témoins	1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg	ANOVA	
					F _[3, 35]	p
Fluorène	24,1 ± 1,1	90,1 ± 15,1	105,4 ± 12,5	379,9 ± 45,8 **	40,7	<0,01
9-OH fluorène	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,1	10,9 ± 2,5	398,2 ± 90,6 **	17,4	<0,01
3-OH fluorène	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1 **	16,0	<0,01
2-OH fluorène	0,2 ± 0,1	1,6 ± 0,2	21,3 ± 2,6	176,3 ± 24,8 **	42,4	<0,01

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

IV. Discussion

IV.1. Effets du fluorène

Ces deux études préliminaires réalisées chez l'animal adulte ont permis de mettre en évidence la neurotoxicité du fluorène après l'administration répétée du polluant par deux voies d'entrées classiquement utilisées en toxicologie expérimentale, la voie intrapéritonéale et la voie orale. Les doses testées, en-dessous des valeurs limites établies par l'USEPA (1989), ont néanmoins montré des modifications comportementales et physiologiques dans les deux études. En particulier, l'administration du polluant par voie *i.p.* a induit une diminution de l'anxiété chez les animaux traités à 1 et 10 mg/kg/j et une augmentation du niveau d'activité uniquement chez les animaux ayant été traités à 10 mg/kg/j de fluorène. D'autre part, les rats traités par voie orale à 1 mg/kg/j de fluorène ont également montré une réduction du niveau d'anxiété et une augmentation du niveau d'activité. Dans les deux études, les niveaux d'anxiété et d'activité des animaux ont ainsi été perturbés aux deux plus faibles doses testées. Un faible déficit de la mémoire immédiate a également été observé chez les animaux traités au fluorène par voie *i.p.* et orale, mais aucune atteinte majeure des capacités d'apprentissage à long terme n'a été observée dans les deux études.

Au plan physiologique dans les deux études, le traitement des animaux à la plus forte dose testée, 100 mg/kg/j, a montré un effet sur la prise de poids des animaux suite à la 1^{ère} administration de fluorène. Ces animaux ont pris moins de poids que les témoins entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour de traitement, et malgré une croissance normale les jours suivants, leur poids moyen est resté inférieur à celui des témoins tout au long de l'expérimentation. Par ailleurs, une augmentation du poids du foie des animaux traités à 100 mg/kg/j par voie *i.p.* et de l'ensemble des animaux traités au fluorène par voie orale a été observée à l'issue du traitement. Ces résultats indiquent que l'administration répétée de fluorène aux doses testées est susceptible d'induire une toxicité systémique chez le rat.

IV.2. Comparaison des deux voies d'entrées

Les deux voies d'administration utilisées pour tester la neurotoxicité du fluorène se distinguent du fait de l'absence d'un effet de 1^{er} passage hépatique dans le cas d'administration par la voie *i.p.* contrairement au traitement par voie orale. En administrant un composé par voie *i.p.* on court-circuite la barrière gastro-intestinale. Administré par voie orale, le composé subit un métabolisme intestinal et

hépatique avant d'atteindre la circulation systémique. De fait, des quantités plus importantes de fluorène sont susceptibles d'atteindre le compartiment cérébral lorsque la solution est administrée par voie *i.p.* Les résultats des dosages cérébraux infirment cette hypothèse, car hormis à la plus forte dose où de plus importantes quantités de fluorène, de 9- et de 3-OH fluorène ont été mesurées chez les animaux traités par voie *i.p.* comparé à ceux traités par voie orale, de plus faibles concentrations du polluant et de ses métabolites ont été observées chez les animaux traités par voie *i.p.* à 1 et 10 mg/kg/j. Ce résultat suggère une métabolisation accrue du fluorène lorsqu'il est administré à 100 mg/kg/j par voie orale. De plus, des concentrations systématiquement plus élevées de 2-OH fluorène ont été observées chez les animaux traités par voie orale comparé à ceux traités au fluorène par voie *i.p.*, montrant potentiellement l'implication du métabolisme périphérique dans la présence de ce métabolite au niveau cérébral.

IV.3. Concentrations cérébrales du fluorène et de ses métabolites

Dans les deux études, même si des quantités négligeables de fluorène et de ses trois métabolites testés ont été mesurées au niveau cérébral (les concentrations mesurées au niveau du cerveau représentant moins de 0,001% de la quantité administrée), les modifications mises en évidence montrent que celles-ci ont suffi à induire une toxicité comportementale et systémique chez le rongeur. En particulier, seuls les animaux présentant des concentrations moyennes en fluorène inférieures à 100 ng/g de tissu cérébral ont montré des altérations comportementales dans les deux études, indiquant que seule l'exposition aux deux plus faibles doses testées a induit des effets neurotoxiques.

Par ailleurs, la présence chez les animaux témoins de fluorène et d'hydroxymétabolites au niveau cérébral renseigne sur le fait que les animaux sont de par leur environnement contaminés au fluorène (nourriture, air ambiant).

L'administration de fluorène par voie *i.p.* ou orale est susceptible d'induire des effets neurotoxiques et systémique chez les animaux traités pendant 28 jours à 1, 10 et 100 mg/kg/j. En particulier, des modifications comportementales affectant le niveau d'anxiété et l'activité ont été observées chez les animaux traités aux deux plus faibles doses et des troubles physiologiques ont principalement été montrés chez ceux traités à la plus forte dose, montrant aussi dans les deux études que les mêmes composantes comportementales ont été affectées par le traitement au fluorène et que des effets similaires sur la physiologie des animaux ont été observés en réponse aux mêmes doses de polluant. Des résultats distincts concernant les concentrations cérébrales de la molécule mère et de ses métabolites ont également été mis en évidence entre les animaux traités par voie *i.p.* et ceux traités par voie orale, suggérant un métabolisme propre à la voie d'entrée de la molécule.

Chapitre 2 : Toxicité neurocomportementale de l'exposition aérienne répétée de 14 jours au fluorène chez le rat adulte

I. Objectifs

Le but de cette exposition était d'une part, de développer un modèle d'exposition des rongeurs à l'inhalation de fluorène et d'autre part, d'évaluer la toxicité du composé inhalé chez l'animal adulte.

Dans un 1^{er} temps, un modèle de génération d'atmosphère contaminée en fluorène permettant d'exposer des animaux adultes à l'inhalation stricte du composé a été mis au point (**Section introductive : I.3.3.**). Dans un 2^{ème} temps, les effets de l'exposition sur l'activité comportementale des animaux ont été caractérisés à l'aide d'une batterie de tests permettant d'évaluer le niveau d'anxiété, l'activité et les capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme. De même, le fluorène et les trois métabolites analysés dans les deux études précédentes ont été dosés au niveau cérébral pour s'assurer de l'exposition des animaux au fluorène.

Le dispositif d'exposition par voie nasale, contraignant les animaux à être maintenus dans des tubes de diamètre restreint, a posé la question du stress potentiellement induit par la situation d'exposition. Pour discriminer l'influence de ce facteur des effets de l'exposition au fluorène, suivant les recommandations de l'OCDE concernant les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009), un 2^{ème} groupe d'animaux témoins, laissés libres de se mouvoir, a été introduit dans l'expérience. Pour estimer le niveau de stress induit par l'exposition, ces animaux ont été testés au plan comportemental et physiologique de la même manière que ceux des autres groupes et des dosages de la corticostérone plasmatique, considérée comme un indicateur de stress, ont été réalisés chez tous les animaux à différents temps de l'étude.

II. Matériel et méthodes

II.1. Protocole expérimental

II.1.1. Animaux

72 rats mâles adultes de souche Wistar Han d'un poids compris entre 225 et 250 g (Harlan, Gannat, France) ont été utilisés pour cette étude. A leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été répartis aléatoirement par cage de deux dans les différents groupes expérimentaux et soumis à une période de stabulation de 7 jours avant le début des expérimentations. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les rats ont été nourris (granulés entretien rat/souris Teklad Global 2016, Harlan, Gannat, France) et ont reçu de l'eau *ad libitum*. Ils ont été maintenus dans des conditions standards d'élevage à l'animalerie de l'INRS (température : $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, humidité : $50\pm 20\%$) selon un cycle lumineux alterné. L'exposition ayant lieu au cours de la journée, la période lumineuse, basée sur ces contraintes, avait lieu de 3 à 15 heures. Un tel cycle a également permis de réaliser les tests comportementaux en phase nocturne à partir de 16 heures. L'ensemble des procédures utilisées quant à l'élevage des animaux étaient en accord avec la directive européenne du 22 septembre 2010 concernant l'expérimentation animale (2010/63/UE).

II.1.2. Exposition

Les animaux ($n=18/\text{groupe}$) ont été exposés à l'inhalation de fluorène (Sigma Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) par voie oro-nasale, 6 heures par jour pendant 14 jours consécutifs. Deux niveaux de contamination atmosphérique, calculés sur la base de données d'expositions réelles issues des travaux de Zanieri *et al.* (2007), ont été étudiés (**Section introductive : I.3.3.1.**). La plus faible concentration, 1,5 ppb ($10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$) de fluorène, a été calculée dans le but de modéliser chez l'animal le niveau de contamination observé chez l'homme vivant en milieu urbain (Kim *et al.* 2008, Zanieri *et al.* 2007), alors que la plus forte concentration de fluorène, 150 ppb ($1\ \text{mg}/\text{m}^3$), modélise davantage des cas d'exposition professionnelle ou accidentelle (Niu *et al.* 2010, Unwin *et al.* 2006).

Parallèlement aux groupes d'animaux exposés, les rats témoins étaient placés dans des chambres d'inhalation ventilées avec une atmosphère non contaminée. A l'issue des 14 jours d'exposition, 12 animaux par groupe ont été testés au plan comportemental et 6 autres ont été sacrifiés pour permettre l'évaluation des effets de l'exposition au fluorène sur les paramètres physiologiques et le dosage des

concentrations cérébrales de fluorène et de trois de ses métabolites.

II.1.3. Génération de fluorène

Conformément à la directive de l'OCDE pour les essais de produits chimiques par inhalation, les expositions ont été réalisées dans des chambres d'inhalation en inox de 200 L équipées de tubes de contention (L : 25 cm, diamètre intérieur : 5,5 cm) permettant d'exposer les animaux par voie nasale stricte (OCDE 2009). Un flux d'air dynamique et réglable (4-5 m³/h) a été assuré dans chaque chambre, celles-ci ayant été maintenues sous pression négative (5 mmH₂O) pour prévenir toute fuite vers l'extérieur. L'air d'entrée dans les cellules a par ailleurs été filtré et conditionné à une température de 22±1°C et une humidité relative de 55±10%. L'atmosphère des chambres d'inhalation a été contaminée par passage d'air au-dessus d'un lit solide thermorégulé de fluorène. Dans ces conditions de génération, le fluorène présent dans l'atmosphère générée était exclusivement sous forme gazeuse, l'absence totale d'aérosol ayant été confirmée à l'aide d'un photomètre à diffusion de lumière (pDR1000AN dust monitor, Thermo Scientific). En accord avec les recommandations de l'OCDE, la concentration en fluorène dans l'air, la température et l'humidité relative de chaque chambre ont été contrôlées régulièrement au cours de l'exposition (OCDE 2009).

II.1.4. Métrologie atmosphérique

Au cours de chaque séance d'exposition, les concentrations atmosphériques de fluorène dans les chambres d'inhalation ont été analysées. Deux et six prélèvements d'air ont ainsi quotidiennement été réalisés dans les cellules consacrées respectivement au niveau d'exposition de 1,5 et 150 ppb de fluorène. L'atmosphère a été échantillonnée par aspiration au travers de tubes (diamètre interne : 4 mm) contenant une résine adsorbante (Amberlite XAD-2). Le fluorène retenu sur le tube à adsorption a ensuite été désorbé à l'aide d'un solvant (acétonitrile) contenant un étalon interne (anthracène à 400 mg/L). La solution a ensuite été analysée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Varian CP-3800) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les échantillons ont été séparés sur une colonne capillaire apolaire (CP-Sil 5 ; 30 m × 0,53 mm × 1,5 µm) avec l'azote comme gaz vecteur à un débit de 4 mL/min. Le programme de température de la colonne était le suivant : 190°C pendant 4 min, puis augmentation jusqu'à 235°C à raison de 15°C/min, puis maintien de cette température pendant 2 min. L'injecteur (flash 1061) et le détecteur ont respectivement été maintenus à 240°C et 250°C. L'atmosphère des deux chambres témoins a également été analysée au cours de la même période pour s'assurer que l'air entrant dans ces cellules n'était pas contaminée.

II.1.5. Quantification des concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites

Après euthanasie de la série d'animaux consacrée à la mesure de différents paramètres physiologiques, les cerveaux ont été prélevés et congelés en vue de l'analyse des concentrations tissulaires de fluorène et de trois de ses métabolites. La méthode analytique utilisée pour doser la présence de ces molécules au niveau cérébral était la même que celle décrite dans les deux études précédentes (*Chapitre 1 : II.4.*).

II.1.6. Evaluation du stress

Le maintien des animaux dans des tubes, nécessaire à l'exposition à une atmosphère contaminée par voie nasale, se rapportant à un modèle de stress classiquement utilisé consistant à placer les animaux dans des tubes de contention (Harris *et al.* 2004, Marquez *et al.* 2004, Zelena *et al.* 2003, McDougall *et al.* 2000, Irvine *et al.* 1997, Willner 1997), deux niveaux de vérification ont été introduits dans l'étude pour permettre de distinguer les effets du stress induit par cette condition d'exposition de ceux du contaminant, comme le recommande l'OCDE pour les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009). Deux groupes d'animaux témoins ont été constitués : un groupe de rats placés dans des tubes semblables à ceux permettant d'exposer les animaux par voie nasale (groupe appelé « Témoins contendus ») et un groupe d'animaux placés librement dans une cellule (groupe appelé « Témoins non contendus »). De plus, pour minimiser les effets du stress potentiellement induits lors de l'exposition, les animaux des trois groupes placés en contention ont préalablement été habitués à être maintenus dans les tubes, en étant placés en contention 6 heures par jour, les 8 jours précédents la période d'exposition (Narciso *et al.* 2003).

Par ailleurs, des marqueurs physiologiques ont été mesurés chez tous les animaux. Le suivi journalier du poids corporel, le poids des glandes surrénales, prélevées après 14 jours d'exposition, et des prélèvements sanguins, effectués à différents moments de l'expérimentation, ont permis d'évaluer la réponse au stress des animaux. A partir des échantillons de sang, les niveaux de corticostérone plasmatique ont pu être déterminés à quatre moments pour chaque animal :

- 1^{er} prélèvement : avant la phase d'habituation aux tubes
- 2^{ème} prélèvement : la veille du 1^{er} jour d'exposition au fluorène
- 3^{ème} prélèvement : après 7 jours d'exposition
- 4^{ème} prélèvement : après 14 jours d'exposition

Pour chaque prélèvement, 1 mL de sang a été collecté à la veine de la queue de l'animal dans des tubes héparinés, puis centrifugé à température ambiante durant 3 min à 1800 g. Le plasma surnageant a ensuite été récupéré, puis stocké à -20°C en vue des analyses ultérieures par chromatographie.

II.1.7. Dosage de la corticostérone plasmatique

Méthode de dosage. Les dosages de corticostérone plasmatique (CORT) ont été réalisés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse avec une colonne analytique Licrospher 100 RP-18 (diamètre interne : 150 × 2 mm, taille de particule : 5 µm, C.I.L. Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France) reliée à un système HPLC Alliance 2690 à une température de 40°C, selon un débit de 0,4 mL/min. L'analyse des spectres UV a été réalisée avec un détecteur à barrette de diodes 996 (Waters). La corticostérone a été détectée à une longueur d'onde de 245 nm et quantifiée par rapport à une gamme de standards en présence d'un étalon interne, la bétaméthasone. Les résultats ont été exploités avec le logiciel Millennium 32 version 3.05.01 (Waters).

Réalisation des standards. Les courbes de standards ont été réalisées par injection de mêmes volumes de solutions contenant des quantités croissantes de CORT (pureté > 99%, Sigma Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) (3,5, 8,75, 17,5, 35 et 52,5 ng/mL) additionnées de la même quantité de bétaméthasone (Sigma Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) dissout dans un mélange eau/acétonitrile (70:30, v/v contenant 0,1% de TFA). La corticostérone a été caractérisée grâce au spectre d'absorption et au temps de rétention. Pour les deux composants, la relation entre l'aire du pic observé et la quantité injectée a été calculée par régression linéaire à l'aide du logiciel de statistique *SPSS 16.0 pour Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Préparation des échantillons et extraction. L'extraction de la CORT a été réalisée suivant la méthode de Ling et Jamali (2003). Pour chaque échantillon, 100 µL de plasma ont été mélangés avec 1 mL d'acétate d'éthyle contenant 50 µg/L de bétaméthasone. Cette préparation a ensuite été agitée pendant 30 s, puis centrifugée pendant 10 min à 1800 g. Le surnageant a ensuite été récupéré et rincé avec 1 mL d'une solution de NaOH à 0,1 M, agité pendant 30 s et centrifugé pendant 10 min à 1800 g. Le surnageant de cette solution a à nouveau été récupéré et évaporé jusqu'à ce que l'échantillon soit sec. Les résidus ont alors été dissous dans 300 µL d'un mélange eau/acétonitrile (70:30, v/v contenant 0,1% de TFA), puis filtrés sur une cartouche de 0,45 µm. Finalement, un volume de 100 µL de chaque échantillon a été injecté dans le système HPLC.

II.2. Mesures physiologiques

Le poids corporel de chaque animal a été relevé quotidiennement depuis le début de la période d'habituation au stress jusqu'à la fin de l'exposition pour permettre d'évaluer les effets potentiels de l'exposition sur la prise de poids des animaux. Après 14 jours d'exposition, une série de 6 rats par groupe a été sacrifiée, le cerveau, le foie et les glandes surrénales de chaque animal ont été prélevés et pesés pour permettre d'évaluer à la fois les effets de l'exposition, mais également l'influence du stress sur le poids de ces organes.

II.3. Analyse comportementale

Les animaux ont été testés au plan de l'anxiété dans le LCS et l'OF, des capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme dans le LY et le labyrinthe radial à 8 branches et de l'activité locomotrice dans ces quatre tests selon les procédures décrites précédemment (**Section méthodologique : III.3.**).

II.4. Analyse statistique

L'ensemble des résultats présentés sont exprimés sous forme de moyenne \pm E.S.M. Les effets de l'exposition au fluorène ont été analysés par une ANOVA à 1 facteur, suivi du test *post hoc* de Dunnett, permettant de comparer les performances des animaux des deux groupes exposés au fluorène à celles des rats du groupe témoin de référence, à savoir du groupe « Témoins contenus ». Les variables mesurées dans le labyrinthe radial à 8 branches ont été analysées par une ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur un facteur. Concernant l'évaluation des effets du stress imposé par le dispositif, les performances aux tests et les données physiologiques relevées pour les animaux du groupe « Témoins contenus » ont été comparées à celles des rats du groupe « Témoins non contenus » par le test *t* de Student. Le traitement statistique a été réalisé à l'aide du logiciel *SPSS 16.0 pour Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), le seuil de significativité étant fixé à $p = 0,05$.

III. Résultats

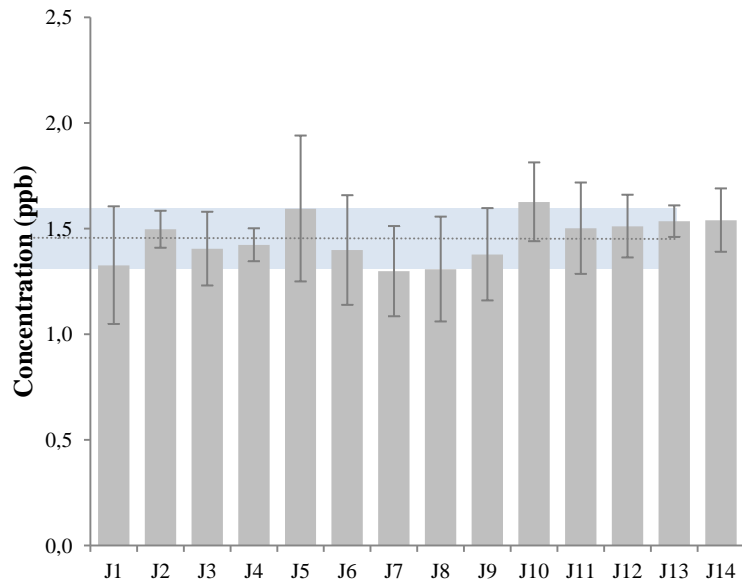
III.1. Concentrations atmosphériques de fluorène

Sur l'ensemble de la période d'exposition, la concentration moyenne de fluorène dans les chambres d'inhalation était pour la plus faible concentration testée de $1,41 \pm 0,13$ ppb et pour la plus forte concentration de $145,3 \pm 11,2$ ppb (**Figures 9a et 9b**). La température et l'humidité relative relevées dans les quatre cellules au cours des 14 jours d'exposition étaient en moyenne de $22,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$ et $55,6 \pm 1,5\%$, respectivement (**Figures 10a et 10b**). Les paramètres relevés n'étant pas significativement différents des valeurs cibles, l'exposition a respecté les limites recommandées par la directive 403 de l'OCDE concernant les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009). Parallèlement à ces résultats, les prélèvements d'air effectués dans les deux chambres témoins au cours de la période d'exposition n'ont montré aucun niveau détectable de fluorène.

III.2. Concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites

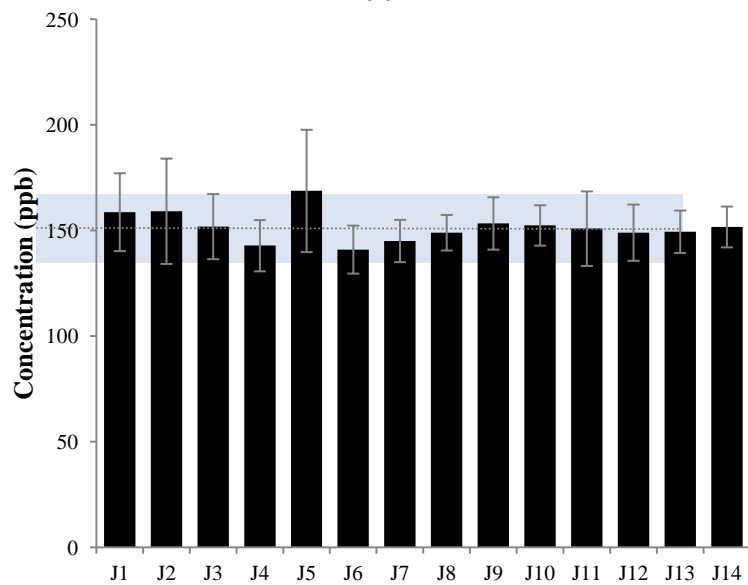
La présence de la molécule mère a été révélée dans tous les groupes d'animaux de l'étude et paradoxalement, une concentration significativement plus faible a été mesurée chez les animaux exposés à 150 ppb de fluorène comparé aux témoins (**Tableau 24**). De plus, sur les trois métabolites analysés, seuls le 9- et le 2-OH fluorène ont été détectés au niveau cérébral (**Tableau 24**). D'une part, la présence de 9-OH fluorène a été quantifiée dans tous les groupes et une concentration significativement plus importante de ce métabolite a été observée chez les rats exposés à 150 ppb de fluorène comparé aux témoins (**Tableau 24**). D'autre part, le 2-OH fluorène a été détecté uniquement chez les animaux exposés au fluorène. En particulier, une concentration proche de la limite de détection a été révélée chez les rats exposés à 1,5 ppb et une concentration significativement plus importante de ce métabolite a été analysée chez ceux exposés à 150 ppb de fluorène (**Tableau 24**).

9a



moyenne \pm E.S.M.

9b



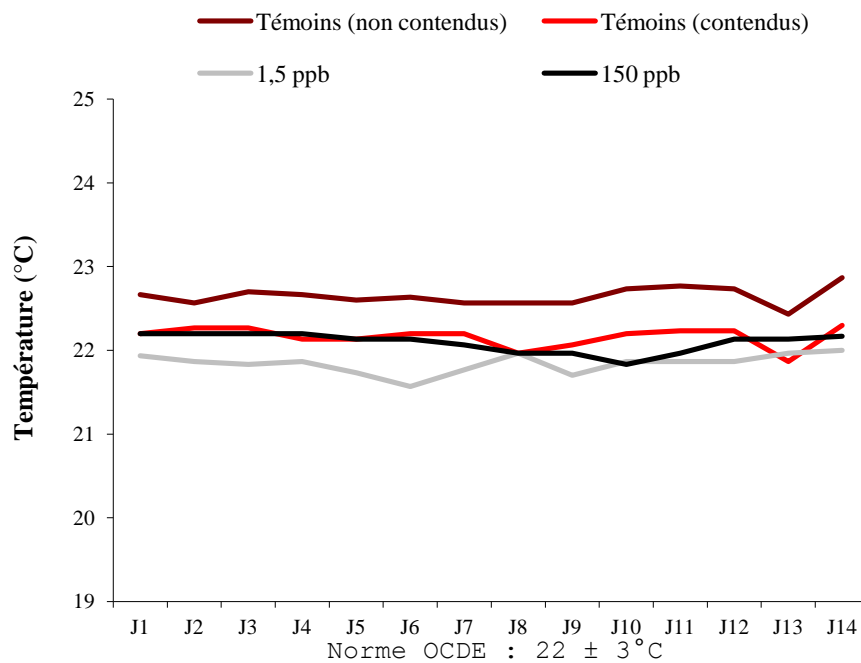
moyenne \pm E.S.M.

Figures 9a et 9b : Concentrations de fluorène générées dans les cellules contaminées quotidiennement pendant 14 jours à 1,5 ppb (9a) à 150 ppb (9b)

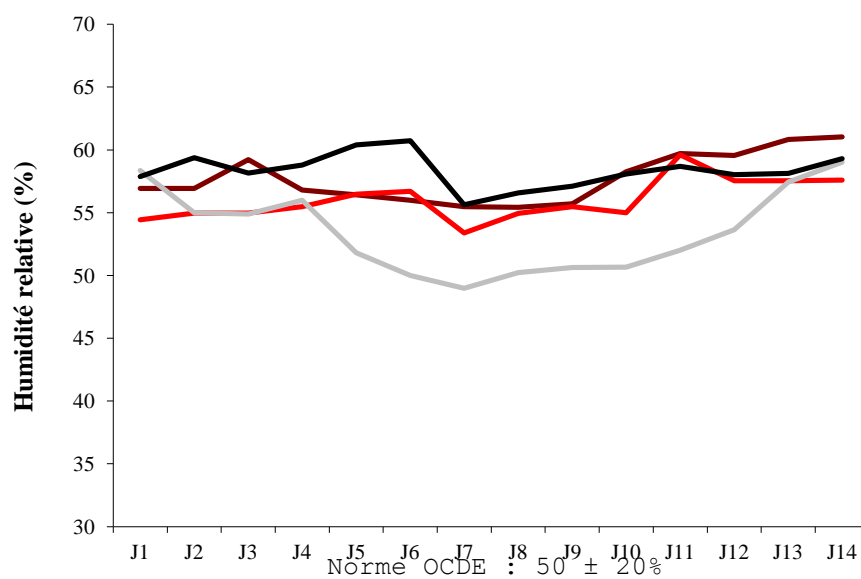
..... Moyenne des 14 jours d'exposition

■ Concentrations autorisées par l'OCDE (moyenne \pm 10%)

10a



10b



Figures 10a et 10b : Moyennes de la température (10a) et de l'humidité relative (10b) relevées dans les cellules d'exposition des animaux des quatre groupes

Tableau 24 : Concentrations cérébrales de fluorène et de 3 de ses métabolites mono-hydroxylés après inhalation répétée de fluorène (ng/g de tissu)

	Σ Témoins	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[2, 23]	p
Fluorène	33,1 ± 1,6	21,2 ± 3,7	19,8 ± 0,3 **	13,3	<0,01
9-OH fluorène	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,0	1,4 ± 0,2 *	5,5	<0,05
3-OH fluorène	n.d.	n.d.	n.d.		
2-OH fluorène	n.d.	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1 **	48,3	<0,01

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.d. : non détecté

III.3. Mesures physiologiques

III.3.1. Poids corporel

L'analyse statistique n'a révélé aucun effet de l'exposition au fluorène sur la prise de poids des animaux exposés comparé aux témoins (**Figure 11**).

III.3.2. Poids des organes

Aucune variation significative du poids relatif du cerveau, du foie et des glandes surrénales n'a par ailleurs été mise en évidence entre les animaux exposés au polluant et les témoins après 14 jours d'exposition (**Tableau 25**).

III.3.3. Dosages de la corticostérone plasmatique

De même, aucune différence du taux de corticostérone plasmatique n'a été observée entre les animaux des différents groupes quelque soit le moment de prélèvement de l'échantillon sanguin (**Tableau 25**).

III.4. Analyse comportementale

III.4.1. Labyrinthe en croix surélevé

L'ANOVA à 1 facteur n'a révélé aucune différence significative entre les rats exposés au fluorène et les animaux témoins pour ce qui est du nombre total de branches visitées et du nombre d'entrées dans les BF et dans les BO du LCS (**Tableau 26**). Concernant le temps passé dans les différentes zones du labyrinthe, les rats exposés au fluorène ont montré une augmentation significative du temps passé dans la ZC du test (**Tableau 26**). Une diminution concomitante, mais non significative, de 14 à 18% du temps passé dans les BO a été observée chez ces animaux comparés aux témoins (**Tableau 26**). Par ailleurs, aucune variation du nombre total de redressements et de ceux effectués dans les BF et la ZC n'a été observée entre les animaux des différents groupes. De même, aucune différence concernant le nombre total de *head-dipping* n'a été mise en évidence entre les rats exposés et les témoins. En revanche, une diminution de 7 à 22% du nombre de *head-dipping* effectués en BO a été observée entre les animaux exposés au fluorène et les témoins (**Tableau 26**).

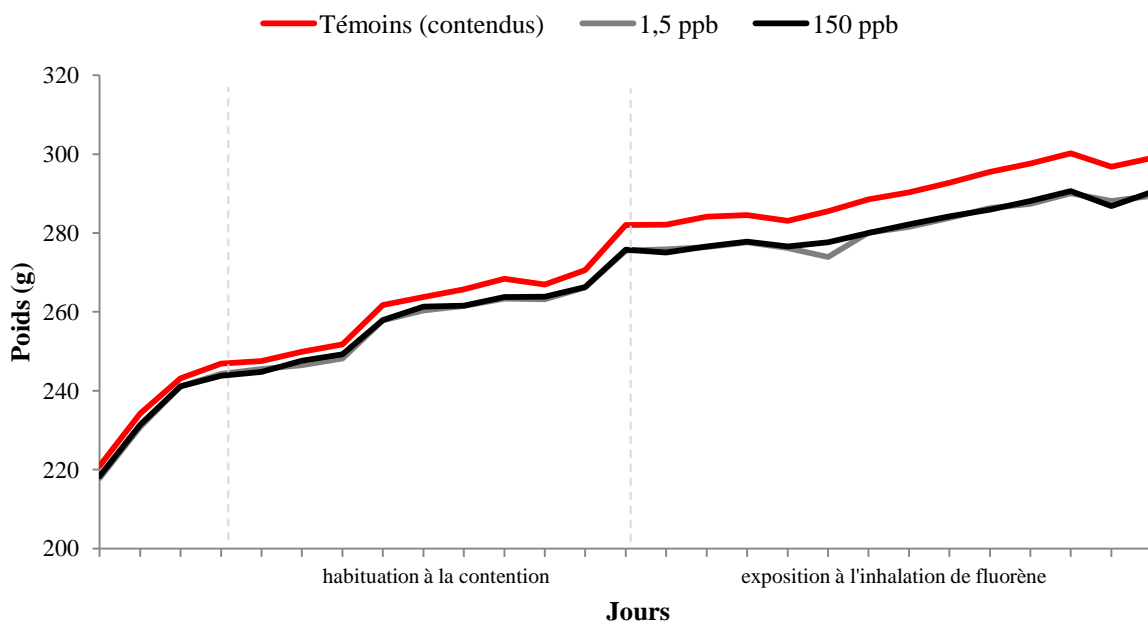


Figure 11 : Evolution du poids corporel moyen des animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb tout au long de l'étude

Tableau 25 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur la physiologie des animaux

	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[2,35]	p
Poids relatif du cerveau (%)	0,60 ± 0,03	0,66 ± 0,01	0,65 ± 0,02	3,1	n.s.
Poids relatif du foie (%)	2,95 ± 0,05	2,83 ± 0,13	2,98 ± 0,03	0,8	n.s.
Poids relatif des glandes surrénales (%)	0,020 ± 0,003	0,021 ± 0,002	0,020 ± 0,001	0,1	n.s.
Niveaux de corticostérone (ng/ml)					
<i>avant l'habituation aux tubes</i>	248,6 ± 22,2	200,8 ± 20,7	197,8 ± 14,5	2,2	n.s.
<i>avant l'exposition</i>	278,3 ± 15,1	272,4 ± 21,4	299,7 ± 27,7	0,4	n.s.
<i>après 7 jours d'exposition</i>	278,1 ± 14,4	309,9 ± 27,6	278,4 ± 15,5	0,8	n.s.
<i>après 14 jours d'exposition</i>	193,3 ± 15,1	215,2 ± 21,9	217,8 ± 19,8	0,5	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Tableau 26 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[2, 35]	p
Entrées en BO	5,9 ± 0,8	5,7 ± 0,6	5,9 ± 0,6	0,0	n.s.
Entrées en BF	9,5 ± 0,7	9,8 ± 0,9	10,8 ± 0,9	0,7	n.s.
Nombre de passages en ZC	14,5 ± 1,0	14,2 ± 0,8	15,7 ± 1,3	0,5	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	37,6 ± 3,1	37,3 ± 4,3	35,0 ± 3,1	0,2	n.s.
Nombre total d'entrées	15,4 ± 1,1	15,4 ± 0,8	16,8 ± 1,4	0,5	n.s.
Temps en BO (s)	87,5 ± 9,7	75,4 ± 12,7	71,7 ± 9,9	0,6	n.s.
Temps en BF (s)	148,7 ± 11,2	147,8 ± 14,8	148,8 ± 10,7	1,0	n.s.
Temps en ZC (s)	63,8 ± 6,3	76,8 ± 5,4 *	79,5 ± 4,6 *	4,4	<0,05
Nombre total de redressements	22,5 ± 1,5	22,3 ± 2,0	25,3 ± 1,2	0,4	n.s.
Redressements en BF (%)	69,8 ± 3,5	72,4 ± 4,3	70,5 ± 2,6	0,2	n.s.
Nombre total de head dipping	7,7 ± 0,8	8,3 ± 0,9	8,2 ± 1,2	0,9	n.s.
Head dipping en BO (%)	62,3 ± 5,7	54,7 ± 7,4	40,0 ± 7,1	2,8	p=0,076

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

III.4.2. Open-field

L'analyse statistique des données relevées dans l'OF n'a montré aucune variation significative du nombre total de cases traversées au cours du test entre les animaux des différents groupes (**Tableau 27**). Les animaux exposés à 1,5 et 150 ppb de fluorène ont néanmoins traversé plus de cases (respectivement 7% et 9%) que les animaux témoins (**Tableau 27**). Cette observation est relative à l'augmentation significative du pourcentage de cases traversées dans la ZC observée chez les rats exposés comparé aux témoins (**Tableau 27**). De plus, des deux groupes d'animaux soumis à l'inhalation de fluorène, seuls ceux exposés à 1,5 ppb ont également montré une augmentation significative du temps passé dans la ZC du test comparé aux témoins (**Tableau 27**).

III.4.3. Labyrinthe en Y

L'ANOVA à 1 facteur n'a montré aucune différence concernant la capacité d'alternance entre les différents groupes, compte tenu de l'analyse du pourcentage de triplets justes réalisés par les animaux au cours du test (**Tableau 28**). Par ailleurs, l'exposition au fluorène n'a eu aucune incidence sur l'activité des animaux quelque soit la variable mesurée dans ce test (nombre total de branche visitées, nombre de branches visitées par minute ou nombre de branches visitées au cours de la 1^{ère} minute de test) (**Tableau 28**).

III.4.4. Labyrinthe radial à 8 branches

L'ANOVA à 2 facteurs n'a montré aucun effet de l'exposition au fluorène sur le comportement des animaux dans ce test (**Tableau 29**).

En revanche, un effet significatif du jour de test a été observé sur l'ensemble des animaux (**Tableau 29**). Au cours des 12 jours, ceux-ci ont significativement été plus rapides à réaliser le test, réduit leur nombre d'erreurs, visité un plus grand nombre de branches avant la 1^{ère} erreur et visité plus de branches par minute, montrant une amélioration globale des performances d'apprentissage de tous les animaux (**Tableau 29**).

Par ailleurs, aucun effet d'interaction entre les deux facteurs considérés n'a été révélé par l'analyse statistique (**Tableau 29**).

Tableau 27 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur le comportement lié à l'activité dans l'open-field

	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[2, 35]	p
Temps en ZC (s)	12,3 ± 8,5	20,7 ± 9,1 *	11,0 ± 5,4	5,4	<0,01
Temps en ZI (s)	32,3 ± 11,9	39,3 ± 20,8	36,3 ± 16,3	0,5	n.s.
Temps en ZP (s)	255,5 ± 13,1	236,7 ± 24,1	252,8 ± 19,1	3,2	p=0,055
Nombre total de cases traversées	149,2 ± 28,1	159,7 ± 25,7	161,3 ± 46,2	0,4	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	3,1 ± 1,2	5,6 ± 2,5 ^a	6,1 ± 3,6 *	4,3	<0,05
Cases traversées en ZI (%)	16,9 ± 4,9	16,1 ± 5,7	17,9 ± 5,9	0,3	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	79,6 ± 6,2	78,3 ± 7,4	76,0 ± 9,1	0,7	n.s.
Nombre total de redressements	26,3 ± 7,9	29,3 ± 10,4	29,42 ± 9,0	0,4	n.s.
Redressements en ZP (%)	84,0 ± 17,1	75,2 ± 15,4	78,52 ± 15,9	0,9	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : p=0,056

* : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

Tableau 28 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur les capacités de mémorisation à court terme dans le labyrinthe en Y

	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[2, 35]	p
Alternance spontanée (%)	64,4 ± 3,1	60,4 ± 12,6	59,5 ± 3,8	0,6	n.s.
Nombre total d'entrées	31,5 ± 1,8	35,8 ± 1,3	32,5 ± 1,9	1,7	n.s.
Nombre de branches visitées (1 ^{ère} min)	5,1 ± 1,0	5,5 ± 1,1	5,2 ± 0,9	0,4	n.s.
Redressements	69,3 ± 14,0	80,3 ± 14,7	70,3 ± 15,8	2,0	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Tableau 29 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches

	Jour 1	Jour 4	Jour 8	Jour 12	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour		
					F _[2,35]	p	F _[2,35]	p	F _[2,35]	p	
Temps total (s)											
Témoins (contendus)	129,7 ± 10,6	86,2 ± 9,6	68,7 ± 4,5	76,1 ± 8,0	1,3	n.s.	20,4	<0,01	0,5	n.s.	
1,5 ppb	119,9 ± 11,7	81,7 ± 8,6	72,9 ± 4,3	69,2 ± 2,5							
150 ppb	132,0 ± 13,5	76,2 ± 3,9	69,9 ± 4,1	56,3 ± 3,2							
Nombre total de branches visitées											
Témoins (contendus)	12,2 ± 0,7	9,8 ± 0,6	9,3 ± 0,6	9,4 ± 0,8	0,4	n.s.	12,4	<0,01	0,3	n.s.	
1,5 ppb	12,3 ± 1,3	9,8 ± 0,6	9,1 ± 0,3	8,5 ± 0,2							
150 ppb	12,6 ± 1,1	10,2 ± 0,6	9,3 ± 0,5	8,3 ± 0,2							
Nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur											
Témoins (contendus)	5,8 ± 0,4	6,8 ± 0,4	6,5 ± 0,5	6,9 ± 0,5	0,5	n.s.	11,5	<0,01	0,9	n.s.	
1,5 ppb	5,4 ± 0,6	6,7 ± 0,4	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,3							
150 ppb	4,5 ± 0,6	6,2 ± 0,5	7,4 ± 0,3	6,8 ± 0,6							
Nombre de branches visitées / min											
Témoins (contendus)	5,7 ± 0,3	7,1 ± 0,4	7,7 ± 0,2	7,3 ± 0,5	2,5	n.s.	22,9	<0,01	0,4	n.s.	
1,5 ppb	5,9 ± 0,6	7,3 ± 0,4	8,0 ± 0,3	7,6 ± 0,1							
150 ppb	6,1 ± 0,5	8,1 ± 0,4	8,1 ± 0,3	9,3 ± 0,2							

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

III.5. Effets du stress de contention

L'analyse de l'évolution du poids corporel des animaux des deux groupes témoins a montré une différence significative dans la prise de poids des animaux. Sur l'ensemble de la période d'expérimentation, les animaux témoins placés en contention ont significativement pris moins de poids que les rats témoins non contenus (**Figure 12**). Concernant les niveaux de corticostérone plasmatique, le poids relatif du cerveau, du foie et des glandes surrénales, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes témoins (**Tableau 30**).

Au plan comportemental, une augmentation significative du nombre total de cases traversées dans l'OF et du nombre total de branches visitées dans le LY a été mise en évidence chez les animaux témoins placés dans les tubes comparés aux rats témoins non contenus (**Tableaux 31b et 31c**). En parallèle, aucun effet de la contention n'a été observé sur le niveau d'anxiété et les capacités d'apprentissage à court et à long terme (**Tableaux 31a, 31c et 31d**).

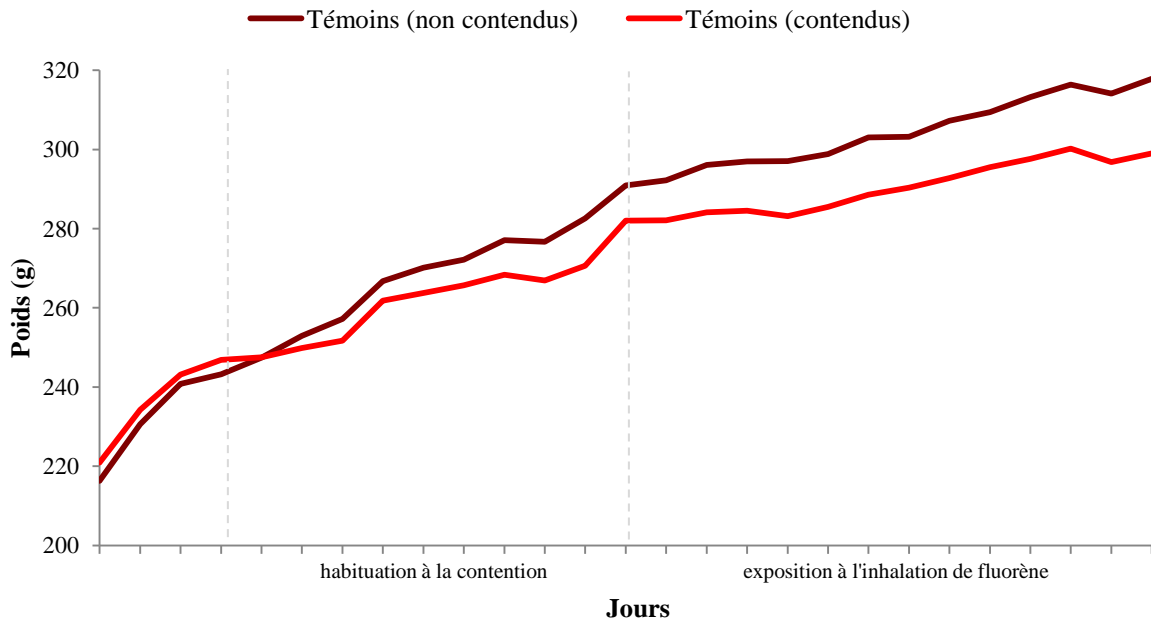


Figure 12 : Evolution du poids corporel moyen des animaux des deux groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contendus) tout au long de l'étude

Tableau 30 : Effets du stress de contention imposé par le dispositif d'exposition par voie nasale sur la physiologie des animaux

	Témoins (non contenus)	Témoins (contendus)
Poids relatif du cerveau (%)	0,59 ± 0,01	0,60 ± 0,03
Poids relatif du foie (%)	3,15 ± 0,09	2,95 ± 0,05
Poids relatif des glandes surrénales (%)	0,013 ± 0,002	0,020 ± 0,003
Niveaux de corticostérone (ng/ml)		
<i>avant l'habituation aux tubes</i>	299,1 ± 32,4	248,6 ± 22,2
<i>avant l'exposition</i>	283,4 ± 16,2	278,3 ± 15,1
<i>après 7 jours d'exposition</i>	252,3 ± 21,9	278,1 ± 14,4
<i>après 14 jours d'exposition</i>	163,3 ± 31,0	193,3 ± 15,1

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Le test *t* de Student a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

Tableaux 31a et 31b : Effets du stress de contention imposé par le dispositif d'exposition par voie nasale sur le comportement lié à l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé (31a) et à l'activité dans l'open-field (31b)

31a

	Témoins (non contendus)	Témoins (contendus)
Entrées en BO	5,7 ± 0,8	5,9 ± 0,8
Entrées en BF	8,9 ± 0,5	9,5 ± 0,7
Nombre de passages en ZC	13,6 ± 1,1	14,5 ± 1,0
Pourcentages d'entrées en BO	36,2 ± 4,3	37,6 ± 3,1
Nombre total d'entrées	14,6 ± 1,1	15,4 ± 1,1
Temps en BO (s)	78,5 ± 11,1	87,5 ± 9,7
Temps en BF (s)	134,0 ± 15,8	148,7 ± 11,2
Temps en ZC (s)	87,5 ± 7,3	63,8 ± 6,3 *
Nombre total de redressements	20,4 ± 1,2	22,5 ± 1,5
Redressements en BF (%)	64,0 ± 5,7	69,8 ± 3,5
Nombre total de head dipping	8,3 ± 1,2	7,7 ± 0,8
Head dipping en BO (%)	47,3 ± 7,8	62,3 ± 5,7

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Le test *t* de Student a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contendus)

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

31b

	Témoins (non contendus)	Témoins (contendus)
Temps en ZC (s)	10,2 ± 1,8	12,3 ± 8,5
Temps en ZI (s)	43,6 ± 7,7	32,3 ± 11,9
Temps en ZP (s)	245,5 ± 8,5	255,5 ± 13,1
Nombre total de cases traversées	117,8 ± 10,5	149,2 ± 28,1 *
Cases traversées en ZC (%)	5,1 ± 0,9	3,1 ± 1,2
Cases traversées en ZI (%)	21,4 ± 2,5	16,9 ± 4,9
Cases traversées en ZP (%)	73,5 ± 3,1	79,6 ± 6,2
Nombre total de redressements	26,2 ± 2,1	26,3 ± 7,9
Redressements en ZP (%)	76,3 ± 4,7	84,0 ± 17,1

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Le test *t* de Student a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contendus)

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

Tableaux 31c et 31d : Effets du stress de contention imposé par le dispositif d'exposition par voie nasale sur les capacités de mémorisation à court terme dans le labyrinthe en Y (31c) et sur les capacités d'apprentissage spatial dans le labyrinthe radial à 8 branches (31d)

31c

	Témoins (non contenus)	Témoins (contendus)
Alternance spontanée (%)	57,5 ± 2,9	64,4 ± 3,1
Nombre total d'entrées	25,3 ± 1,1	31,5 ± 1,8 **
Nombre de branches visitées (1 ^{ère} min)	4,2 ± 0,4	5,1 ± 1,0
Redressements	62,8 ± 4,7	69,3 ± 14,0

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Le test *t* de Student a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contenus)

31d

	Jour 1	Jour 4	Jour 8	Jour 12	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour	
					F _[1, 23]	<i>p</i>	F _[1, 23]	<i>p</i>	F _[1, 23]	<i>p</i>
Temps total (s)										
Témoins (non contenus)	126,8 ± 11,2	107,1 ± 15,4	85,9 ± 9,3	71,9 ± 5,2	0,4	n.s.	5,1	<0,01	0,6	n.s.
Témoins (contendus)	129,7 ± 10,6	86,2 ± 9,6	68,7 ± 4,5	76,1 ± 8,0						
Nombre total de branches visitées										
Témoins (non contenus)	10,5 ± 0,5	9,9 ± 0,5	9,8 ± 0,8	9,8 ± 0,5	0,1	n.s.	3,6	<0,01	0,8	n.s.
Témoins (contendus)	12,2 ± 0,7	9,8 ± 0,6	9,3 ± 0,6	9,4 ± 0,8						
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur										
Témoins (non contenus)	4,8 ± 0,7	6,0 ± 0,5	7,2 ± 0,3	6,2 ± 0,4	1,5	n.s.	4,7	<0,01	1,0	n.s.
Témoins (contendus)	5,8 ± 0,4	6,8 ± 0,4	6,5 ± 0,5	6,9 ± 0,5						
Nombre de branches visitées / min										
Témoins (non contenus)	5,3 ± 0,5	6,5 ± 0,7	7,2 ± 0,5	7,5 ± 0,6	0,1	n.s.	8,7	<0,01	0,7	n.s.
Témoins (contendus)	5,7 ± 0,3	7,1 ± 0,4	7,7 ± 0,2	7,3 ± 0,5						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs en mesures répétées sur 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

76d

75d

IV. Discussion

IV.1. Concentrations atmosphériques de fluorène

Le suivi des atmosphères réalisé dans les deux chambres contaminées durant les 14 jours d'exposition a révélé des niveaux de contamination en accord avec les concentrations de fluorène choisies. De même, le contrôle effectué dans les deux chambres témoins a montré l'absence de niveaux détectables de fluorène dans l'air de ces cellules. Ces résultats ont ainsi permis de garantir l'exposition des animaux de chaque groupe aux niveaux de contamination prédéfinis.

IV.2. Concentrations cérébrales de fluorène et de ses métabolites

Les dosages cérébraux du fluorène et de trois de ses métabolites ont révélé la présence de la molécule mère et du 9-OH fluorène chez les animaux des quatre groupes expérimentaux. La quantification du polluant et de ses métabolites chez les rats témoins indique en particulier que ceux-ci ont été exposés au fluorène de par leur environnement, montrant la difficulté de s'affranchir de l'influence de la pollution liée aux HAP. Le suivi des concentrations atmosphérique ayant révélé l'absence de fluorène dans l'air des deux chambres témoins et des niveaux détectables du polluant dans les deux chambres contaminées, une autre source de contamination du modèle a été supposée, telle que l'eau de boisson, l'alimentation ou la litière servant à aménager les cages, ceux-ci pouvant être contaminés par des processus de fabrication industriels. L'analyse des quantités de HAP présents dans ces différents compartiments a néanmoins montré des niveaux de contamination en-dessous de la limite de détection de 10 ng/L pour l'eau de boisson et de 1 ng/g pour les aliments séchés (excepté pour le fluoranthène et le phénanthrène) et la litière. Une autre étude a alors montré qu'à leur arrivée au laboratoire, les animaux présentaient des niveaux de contamination aux HAP similaires à ceux observés chez les témoins, indiquant qu'une contamination a potentiellement lieu chez le fournisseur (Grova *et al.* 2011).

Par ailleurs, le 2-OH fluorène, considéré comme le biomarqueur de l'exposition au fluorène (Amorim *et al.* 2009, Xia *et al.* 2009), a été détecté uniquement chez les animaux exposés au fluorène, proportionnellement aux concentrations générées dans les chambres d'exposition au fluorène. Ces résultats garantissent ainsi l'exposition des deux groupes d'animaux exposés au fluorène aux niveaux de contamination établis par le suivi des atmosphères.

De plus, des concentrations plus faibles de fluorène ont été observées chez les animaux exposés comparé aux témoins. Un tel résultat suggère que le polluant est susceptible d'être métabolisé par l'organisme, au niveau cérébral ou périphérique, pouvant se traduire par un métabolisme pulmonaire, intestinal et/ou hépatique. En particulier, des études antérieures ont fait l'hypothèse de l'implication d'un métabolisme périphérique dans la génération de plusieurs métabolites mono- et dihydroxylés, susceptibles de s'accumuler dans le tissu cérébral en complément de ceux produits au niveau du cerveau (Grova *et al.* 2008, Shimada 2006). Les résultats de cette étude ont également montré une augmentation significative de la concentration cérébrale en 9-OH fluorène chez les animaux exposés à 150 ppb. La concentration en 2-OH fluorène atteint la limite de détection chez les rats exposés à 1,5 ppb et est significativement plus élevée chez ceux exposés à 150 ppb de fluorène. Les concentrations cérébrales de ces trois métabolites ne suffisent néanmoins pas à expliquer la diminution de fluorène observée chez les animaux exposés au polluant, suggérant que le 2-, le 3- et le 9-OH fluorène sont minoritaires dans la métabolisation de la molécule mère et qu'un ou plusieurs autres métabolites mono- ou dihydroxylés, non étudiés ici, sont peut-être produits en plus grandes quantités. Néanmoins, d'autres métabolites du fluorène n'ont pas pu être analysés du fait de l'indisponibilité commerciale des standards correspondants.

IV.3. Effets comportementaux

L'analyse des effets de l'exposition à l'inhalation de fluorène sur le comportement des animaux a montré que le polluant est susceptible de moduler le niveau d'anxiété des animaux dans le LCS et l'OF, deux tests largement utilisés chez le rongeur dans l'évaluation du niveau d'anxiété, de l'émotivité et de la réponse au stress (Gould *et al.* 2009, Violle *et al.* 2009).

Dans l'OF, les animaux exposés à 1,5 et 150 ppb de fluorène ont montré une baisse de l'anxiété du fait de l'augmentation significative du nombre de cases traversées dans la zone centrale du labyrinthe par rapport aux témoins. En parallèle, l'augmentation significative du temps passé dans cette zone, observée uniquement chez les rats exposés à 1,5 ppb de fluorène, a signifié une baisse du niveau d'anxiété plus importante chez les animaux exposés à la faible concentration.

Des résultats sensiblement différents ont en revanche été obtenus dans le LCS. Les animaux exposés au fluorène ont passé significativement plus de temps dans la zone de décision du test (ZC), et moins de temps dans les BO comparé aux témoins, indiquant une augmentation sensible du niveau d'anxiété (Violle *et al.* 2009).

Ces résultats divergents s'expliquent potentiellement par les différentes configurations des deux labyrinthes, confrontant les animaux à une situation plus aversive dans le LCS que dans l'OF (Carola *et al.* 2002), ainsi qu'à la capacité du fluorène à moduler le niveau d'anxiété des animaux exposés par inhalation comparé à la diminution significative d'anxiété observée lors de l'administration du polluant par voie *i.p.* ou orale (**Chapitre 1 : IV.**). Ces résultats sont également corrélés avec ceux d'études antérieures obtenus après l'administration par voie orale de B(a)P à des souris adultes (Grova *et al.* 2008), indiquant que les composés de type HAP sont capables de moduler le niveau d'anxiété, relativement à la molécule, à la dose et à la voie d'administration étudiés.

Par ailleurs, aucune atteinte de l'activité locomotrice et des capacités d'apprentissage et de mémorisation n'a été observée chez les animaux exposés au fluorène, suggérant que l'exposition au polluant n'engendre aucune altération des mécanismes cognitifs sous-jacents. Des travaux antérieurs ont en revanche montré que d'autres molécules de type HAP, le B(a)P et le 3-méthylcholanthrène, sont susceptibles de perturber l'apprentissage et les capacités de mémorisation chez l'animal adulte (Grova *et al.* 2007, Wormley *et al.* 2004, Konstandi *et al.* 1997). Cette composante n'étant pas affectée par l'exposition au fluorène, ce composé induit une toxicité comportementale potentiellement distincte de celle du B(a)P ou d'autres HAP, relativement à divers facteurs incluant des variations de la structure de la molécule, son métabolisme, ses caractéristiques pharmacocinétiques et des interactions pouvant avoir lieu au niveau cérébral. Plusieurs études ont notamment montré la capacité du B(a)P à modifier certains processus fonctionnels au niveau du cerveau, tels que l'excitabilité neuronale, le stress oxydatif et certains systèmes de neurotransmission (pour revue cf. Schroeder 2011). Néanmoins, contrairement au B(a)P, aucune donnée sur le fluorène n'est à ce jour disponible quant à sa toxicité cellulaire et moléculaire. Tel que cela est préconisé pour de nombreux composés chimiques, des études complémentaires sur cette molécule devraient être menées afin de déterminer précisément la nature des effets et le mode d'action de ce composé (Grandjean et Landrigan 2006).

IV.4. Effets du stress de contention

Alors que les résultats obtenus chez les animaux exposés au fluorène se réfèrent à ceux du groupe témoin approprié, les mêmes données comportementales et physiologiques ont été relevées chez les animaux témoins libres de se mouvoir dans la chambre d'inhalation et comparées aux résultats des animaux placés en contention. Le but étant de distinguer la contribution du stress imposé par le modèle d'exposition de la toxicité comportementale du fluorène.

Au plan comportemental, une augmentation significative du niveau d'activité a été observée chez

les animaux placés en contention. Par contre, aucune variation concernant le niveau d'anxiété et les performances d'apprentissage n'a été mise en évidence chez ces animaux comparés aux rats libres de se mouvoir. Des travaux antérieurs ont rapporté des résultats divergents concernant les effets du stress chronique de contention l'activité comportementale chez le rongeur, tels qu'une augmentation ou une diminution du niveau d'activité et de l'anxiété, et également l'absence d'effets comportementaux (Gregus *et al.* 2005, Dobovicky et Jezova 2004, Bowman *et al.* 2002). La même variabilité a aussi été observée au cours d'expérimentations basées sur ce modèle de stress au sein du laboratoire (travaux non publiés).

Les modifications comportementales observées peuvent être relatives à l'adaptation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticotrope (HPA). En effet, la réponse de l'axe HPA peut se désensibiliser ou rester stable, en particulier quand le même stressor est répété (Aguilera 1998). La diminution des niveaux de corticostérone plasmatique qui a été observée dans tous les groupes tout au long de la période d'exposition, ainsi que des niveaux plasmatiques comparables entre les deux groupes témoins à tous les temps de prélèvement suggèrent une habitude des animaux en dépit de l'exposition quotidienne au stress de contention. Ces résultats sont en accord avec ceux de Narciso *et al.* (2003) montrant que les animaux sont capables de s'adapter à la contention imposée par le modèle d'exposition par voie nasale après 14 jours d'habitude.

Ainsi, ces résultats montrent que le contexte stressant n'a pas eu d'influence spécifique dans l'exposition au fluorène sur l'activité générale des animaux placés en contention (incluant les animaux témoins et ceux exposés au polluant). Les perturbations significatives observées chez les animaux exposés au fluorène, en comparaison du groupe témoin de référence, montrent ainsi que le polluant est susceptible d'induire une toxicité comportementale spécifique.

Les résultats de cette étude montrent qu'une exposition de 14 jours à l'inhalation de fluorène à des niveaux environnementaux de contamination est susceptible d'induire des troubles comportementaux spécifiques. En particulier, une perturbation du niveau d'anxiété des animaux a été mise en évidence, tandis qu'aucune atteinte du niveau d'activité et des performances d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme n'a été observée suite à l'exposition au polluant.

Par ailleurs, des niveaux significatifs de fluorène et de deux de ses métabolites ont été quantifiés au niveau du cerveau des animaux exposés, montrant que le fluorène est susceptible d'être métabolisé et peut atteindre le compartiment cérébral.

Ainsi, la mise en correspondance des modifications comportementales et des dosages cérébraux du fluorène et de ses métabolites suggère à la fois un rôle de la molécule mère mais également une implication de ses métabolites dans la toxicité cérébrale de ce polluant.

Cette étude contribue finalement à démontrer la vulnérabilité du cerveau adulte à l'exposition aux HAP volatils présents dans l'air ambiant et particulièrement au fluorène.

Chapitre 3 : Etude des effets d'une exposition aérienne chronique au fluorène chez la rate gestante ou allaitante. Effets neurocomportementaux à court et à long terme chez le jeune.

I. Objectifs

Ces deux études ont été menées dans le but d'évaluer les effets de l'exposition périnatale au fluorène sur le développement précoce et à plus long terme des jeunes nés de mères exposées pendant la gestation ou la lactation aux mêmes niveaux de contamination que ceux testés précédemment chez l'animal adulte (*Chapitre 2 : II.1.2.*). Deux phases différentes de la période sensible dans la maturation cérébrale chez le rongeur et transposables à l'homme ont ainsi été expertisées. Pour évaluer, d'une part, les conséquences de cette exposition sur la mise en place des fonctions cérébrales précoces et, d'autre part, le caractère persistant ou retardé de ces effets à l'âge adulte. Pour évaluer les effets de l'exposition sur le développement neuromoteur et sensoriel chez le jeune rat, des tests adaptés ont été réalisés à des âges précis de la naissance au sevrage. Ces mesures, réalisées sur plusieurs jours consécutifs, ont ainsi permis de cerner l'évolution des différentes réactions motrices et aptitudes sensorielles et de révéler un retard de maturation ou une perturbation permanente des fonctions cérébrales sous-jacentes. A l'âge adulte, un ensemble de tests, visant à évaluer les conséquences des expositions précoces au polluant sur le niveau d'anxiété, l'activité exploratoire et les capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme a également été réalisé.

Par ailleurs, le stress de contention imposés aux mères gestantes ou allaitantes étant susceptible d'induire des perturbations dans la mise en place des fonctions sensori-motrices chez le jeune (**Section Introductive : I.3.3.3.**), un 2^{ème} groupe de femelles témoins libres de se mouvoir a été introduit dans les deux études. L'ensemble des jeunes de ces deux études ont été testés de la même manière pour permettre de discriminer la part du stress de contention des effets du fluorène.

II. Matériel et méthodes

II.1. Protocole expérimental

II.1.1. Animaux

Pour chaque étude, 24 rates d'un poids compris entre 125 et 150 g et âgées d'environ 5 semaines, et 14 rats de souche Wistar provenant de chez Harlan (Gannat, France), ont été utilisés. A leur arrivée au laboratoire, ils ont été répartis par animaux du même sexe dans des cages d'habitation (2 animaux / cage) et marqués individuellement pour permettre leur identification. Ces animaux ont été maintenus dans des conditions standards d'élevage dans l'animalerie de l'INRS (température : $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, humidité : $50\pm 20\%$) selon un cycle lumineux alterné (lumière allumée de 7h à 19h). Dans un 1^{er} temps, une période de stabulation de 7 jours a été respectée. La nourriture (aliment Teklad Global 2016, Harlan, Gannat, France) et l'eau étaient disponibles *ad libitum* durant toute l'expérimentation. Les procédures utilisées quant à la manipulation des animaux ont respecté les recommandations de la directive européenne du 22 septembre 2010 concernant l'expérimentation animale (2010/63/UE).

II.1.2. Accouplements

Au préalable, les femelles ont été randomisées dans les différents groupes expérimentaux avant d'être mises en accouplement durant 7 jours consécutifs. Préalablement à la 1^{ère} rencontre entre les mâles et les femelles, les mâles ont été placés individuellement dans des cages d'habitation. Par la suite, chaque jour à 18 heures, 2 femelles étaient mises en contact d'un mâle, dans la cage de ce dernier. Pour juger de la réceptivité des femelles, le comportement sexuel des couples était alors observé durant 10 minutes. Une rate en phase ovulatoire se montre réceptive par des attitudes particulières telles que le frétillement des oreilles, la position de lordose et l'acceptation des tentatives d'approche du mâle. Un frottis vaginal a été réalisé sur chaque femelle 12 heures après l'accouplement des animaux. L'observation des prélèvements au microscope permettait alors de confirmer ou d'invalider la fécondation, par la présence ou l'absence de spermatozoïdes. Un frottis positif déterminait alors le jour 0 de la gestation. Les femelles fécondées étaient dès lors isolées dans une nouvelle cage et les rates non accouplées remises en présence d'un mâle le soir même.

Le jour de la naissance a été considéré comme le jour 0 de la vie postnatale. Le nombre de jeunes dans les portées a été standardisé en le réduisant à 10 le lendemain de la naissance. Chaque mère a ainsi

élevé ses jeunes jusqu'au moment du sevrage, à 21 jours, date à laquelle ils ont été séparés et placés dans une autre cage. Au 30^{ème} jour, les jeunes mâles et les jeunes femelles de chaque portée ont également été séparés.

II.1.3. Expositions

Dans chaque étude, chaque mère a été exposée quotidiennement au fluorène ou à l'air non contaminé, 6 heures par jour (de 9 à 15 heures), pendant 14 jours. Les mêmes concentrations que celles testées dans l'étude adulte (**Chapitre 2 : II.1.2.**), 1,5 ppb (10 µg/m³) et 150 ppb (1 mg/m³), ont été employées. Ainsi, quatre groupes ont été constitués, soit deux groupes de femelles exposées à l'inhalation de fluorène et deux groupes de femelles témoins, les unes étant placées de même que les rates exposées au polluant dans des tubes de contention et les autres étant laissées libres de se mouvoir dans une chambre ventilée avec de l'air non contaminée. Ce 2^{ème} groupe de femelles témoins a, de même que dans l'étude précédente, été inclus dans le but d'évaluer les effets du stress imposé par le dispositif d'exposition.

II.1.3.1. Etude 1 : exposition au cours de la gestation

Après avoir été accouplées, les femelles ont été stabulées à l'animalerie durant les cinq 1^{ers} jours de gestation. Chaque femelle a ensuite été exposée du 6^{ème} au 19^{ème} jour de gestation. L'ensemble des rates ayant été accouplé à des dates différentes, le calendrier d'exposition des animaux a été indexé par rapport à cette date.

II.1.3.2. Etude 2 : exposition au cours de l'allaitement

Après l'accouplement et la confirmation de la fécondation, les femelles ont été randomisées dans les quatre groupes expérimentaux avant la naissance des jeunes. Les dates d'accouplement et de mise bas des femelles étant décalées dans le temps, le calendrier de l'exposition a également été adapté aux âges des différentes portées. Après la naissance, elles ont été soumises à l'exposition au cours d'une période allant du 3^{ème} au 16^{ème} jour de vie postnatale des jeunes (PN3 à PN16). Durant les 6 heures d'exposition quotidienne des mères, les jeunes ont été stabulés dans une armoire ventilée et chauffée à 30°, du fait de leur incapacité à thermoréguler durant les 1^{ers} jours de vie.

II.1.4. Modèle d'exposition

Le système de génération d'atmosphère contaminée qui a permis d'exposer les femelles gestantes ou allaitantes au fluorène était analogue à celui utilisé dans l'étude précédente (**Chapitre 2 : II.1.3.**). Au cours de chaque séance, un suivi des concentrations de fluorène généré dans les deux cellules contaminées, réalisé suivant les modalités décrites précédemment, a également été effectué (**Chapitre 2 : II.1.4.**). De même, l'air des chambres témoins a été contrôlé pour s'assurer de l'absence du polluant.

II.1.5. Evaluation du stress

Au-delà de l'introduction d'un groupe témoin libre de se mouvoir dans le protocole, les femelles destinées à être placées dans les tubes de contention pendant la période d'exposition l'ont été quotidiennement pendant les 8 jours précédents la phase d'accouplement, de manière à les habituer au dispositif d'exposition et à minimiser l'impact du stress de contention sur le développement des jeunes.

II.2. Effets de l'exposition au fluorène

II.2.1. Tests neurodéveloppementaux

Dans les deux études, à partir du 3^{ème} jour après la naissance, le sexe de chaque jeune a été déterminé et chaque raton a été marqué pour être identifié au sein de la portée (OCDE 2007, Avery et Spyker 1977). Dès lors, chaque animal a été testé individuellement à des âges définis au moyen d'une batterie de tests permettant d'évaluer la maturation des fonctions sensori-motrices (**Section méthodologique : III.1.**). Le comportement des mères a également été observé selon les procédures de tests détaillées dans la section précédente (**Section méthodologique : III.2.**).

A PN25, un nombre équivalent de jeunes de chaque sexe et de chaque portée a été testé au plan de l'activité et de l'anxiété dans un OF.

II.2.2. Tests à l'âge adulte

Préalablement au test des animaux à l'âge adulte, le cycle lumineux a été modifié (lumière éteinte pendant 12 heures à partir de 8 heures du matin) à PN30 pour permettre d'effectuer les différents tests durant la phase d'activité des animaux.

A partir de PN60, les animaux ont alors subi une nouvelle série de tests comportementaux visant à

évaluer l'influence des expositions périnatales sur le niveau d'anxiété, l'activité générale et les capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme. Un échantillon de deux mâles et deux femelles de chaque portée a pour cela été constitué et observé dans chacun des tests. Par ailleurs, l'ensemble des mâles a été testé avant les femelles pour éviter d'éventuelles perturbations dues aux odeurs.

II.2.3. Poids corporel

Parallèlement aux tests comportementaux, ont été relevés quotidiennement les poids des mères au cours de la gestation et de l'allaitement (données non présentées) ainsi que le poids des jeunes au cours des trois premières semaines de vie postnatale.

II.3. Analyse statistique

Les données relevées chez le jeune et l'animal adulte ont été analysées en deux temps. Dans un 1^{er} temps, les effets de l'exposition périnatale au fluorène ont été évaluées en comparant les résultats des animaux des deux groupes exposés au fluorène à ceux des rats non exposés mais placés en contention (groupe « Témoins (contendus) »). Les effets de l'exposition sur le développement sensori-moteur des jeunes ont été déterminés par des tests non-paramétriques compte tenu de la distribution des données. Le test du χ^2 de Pearson a été utilisé pour analyser les pourcentages de réussite aux différentes épreuves et les tests de Kruskal-Wallis et de Mann-Whitney pour étudier les performances aux tests. L'évolution des performances au cours de ces tests de développement a été analysée avec un test de Friedman.

Les résultats des tests de comportement maternel ont été étudiés avec un test du χ^2 de Pearson et une ANOVA à 2 facteurs dont l'un était en mesures répétées.

Les données relevées à l'âge adulte ont été analysées par des tests paramétriques. Le test de l'ANOVA à 2 facteurs a été utilisé pour mettre en évidence les effets de l'exposition au fluorène et du sexe dans l'expression du comportement de l'animal. Dans le cas d'un effet significatif du facteur lié à l'exposition au polluant, des comparaisons *a posteriori* ont été réalisées par le test de Dunnett. Par ailleurs, les résultats obtenus dans le test du labyrinthe radial à 8 branches ont été analysés par une ANOVA à 3 facteurs en mesures répétées sur un facteur, pour déterminer, en plus des effets des facteurs principaux précités, l'influence de la répétition du test sur les performances des animaux.

Dans un 2^{ème} temps, l'influence du stress de contention imposé par le placement des mères dans les tubes d'exposition a été analysée. Pour cela, les performances des animaux nés de mères témoins

placées en contention ont été comparées à celles des rats nés de mères témoins libres de se mouvoir selon des procédures comparables à celles citées ci-dessus.

L'ensemble des traitements statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel *SPSS 16.0 pour Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), le seuil de significativité étant fixé à $p = 0,05$.

III. Résultats

III.1. Effets de l'inhalation de fluorène par la rate gestante sur le développement neurocomportemental du jeune

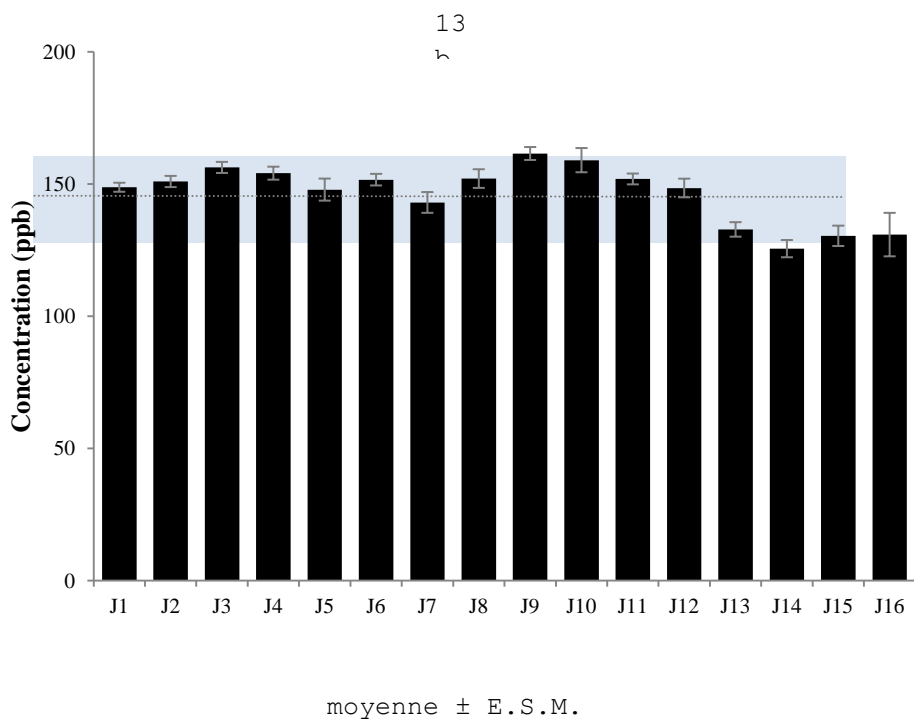
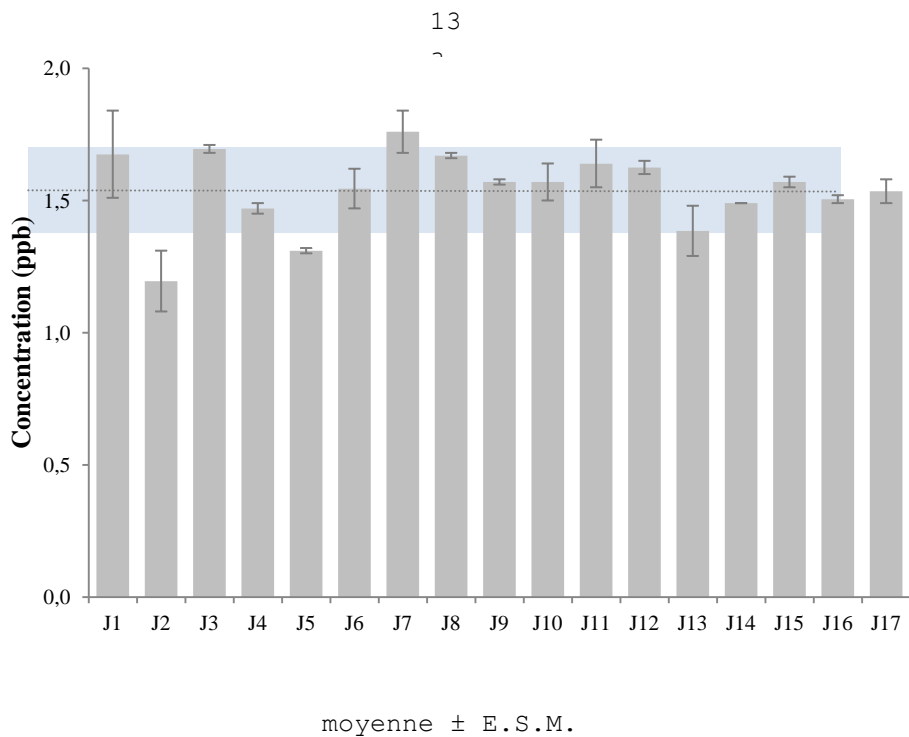
III.1.1. Métrologie atmosphérique

Le suivi des atmosphères des chambres d'inhalation durant la période d'exposition a montré une bonne adéquation entre les concentrations de fluorène générées dans les deux cellules et les niveaux de contamination recherchés (**Figures 13a et 13b**), ainsi que des températures et des taux d'humidité relative relevés dans les quatre chambres aux normes établies par l'OCDE pour les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009) (**Figures 14a et 14b**).

III.1.2. Reproduction

Aucune différence significative concernant le pourcentage d'accouplements réussis, la durée de gestation des femelles, la taille des portées et le sex ratio n'a été relevée entre les quatre groupes (**Tableau 32**). Ces résultats montrent ainsi que l'exposition au fluorène et le stress de contention imposé par le dispositif d'exposition n'ont pas eu d'influence sur le déroulement de la gestation.

Néanmoins, un nombre insuffisant de portées et de jeunes par portée a été obtenu dans certains groupes amenant à ne pas inclure certaines portées dans l'étude.

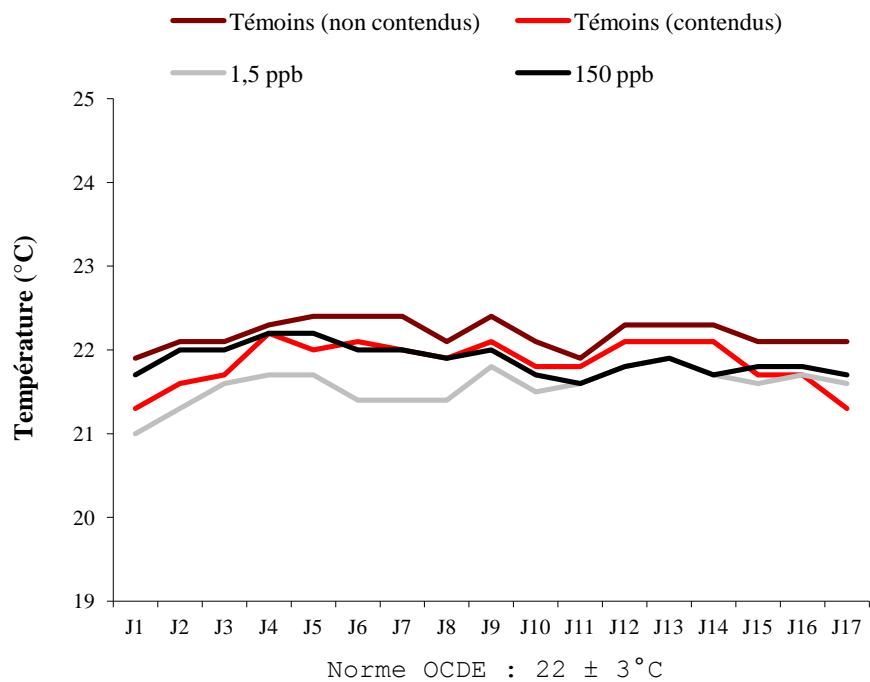


Figures 13a et 13b : Concentrations de fluorène générées dans les cellules contaminées quotidiennement pendant 17 jours à 1,5 ppb (13a) et 16 jours à 150 ppb (13b)

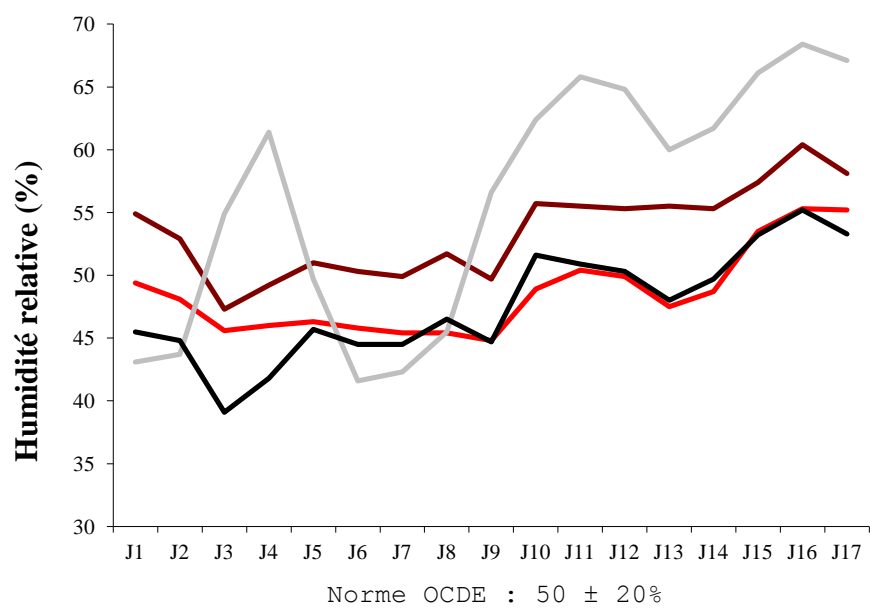
..... Moyenne des 14 jours d'exposition

■ Concentrations autorisées par l'OCDE (moyenne \pm 10%)

14a



14b



Figures 14a et 14b : Moyennes de la température (14a) et de l'humidité relative (14b) relevées dans les cellules d'exposition des animaux des quatre groupes

Tableau 32 : Données relatives à la reproduction

	Témoins (non contenus)	Témoins (contenus)	1,5 ppb	150 ppb	
Nombre de femelles accouplées	5	8	6	6	
Nombre total de ratons	28	31	20	27	

	Témoins (non contenus)	Témoins (contenus)	1,5 ppb	150 ppb	Significativité
Accouplements réussis (%)	80,0	50,0	50,0	66,7	n.s.
Durée de la gestation	22 (21 - 23)	22 (21 - 22)	22 (22 - 22)	22 (21 - 22)	n.s.
Taille de la portée	8 (4 - 12)	8 (5 - 10)	9 (2 - 9)	5 (3 - 12)	n.s.
Sex ratio	0,46	0,48	0,55	0,44	n.s.

Le Khi-deux de Pearson et le test de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer les animaux des quatre groupes. La durée de la gestation et la taille de la portée sont présentées sous forme de médianes et les rangs sont indiqués entre parenthèses.

n.s. : non significatif

III.1.3. Effets de l'exposition au fluorène

III.1.3.1. Tests neurodéveloppementaux

a. Test de retournement

L'analyse statistique n'a montré aucune différence entre les groupes concernant le pourcentage de réussite à PN3 et PN4 (**Figure 15a**). Par contre, à PN5, un plus faible pourcentage de réussite a été observé chez les animaux exposés à 1,5 ppb comparé aux animaux témoins et à ceux exposés à 150 ppb de fluorène (**Figure 15a**). Aucune différence concernant le temps mis par les animaux pour se retourner n'a par ailleurs été mise en évidence entre les trois groupes quelque soit le jour de test (**Figure 15b**).

Parmi les trois groupes étudiés, seuls les animaux exposés à 150 ppb de fluorène ont montré une tendance statistique à l'amélioration de leurs performances au cours des trois jours de test ($F=5,1$; $p=0,08$) (**Figure 15b**).

b. Réflexe d'agrippement

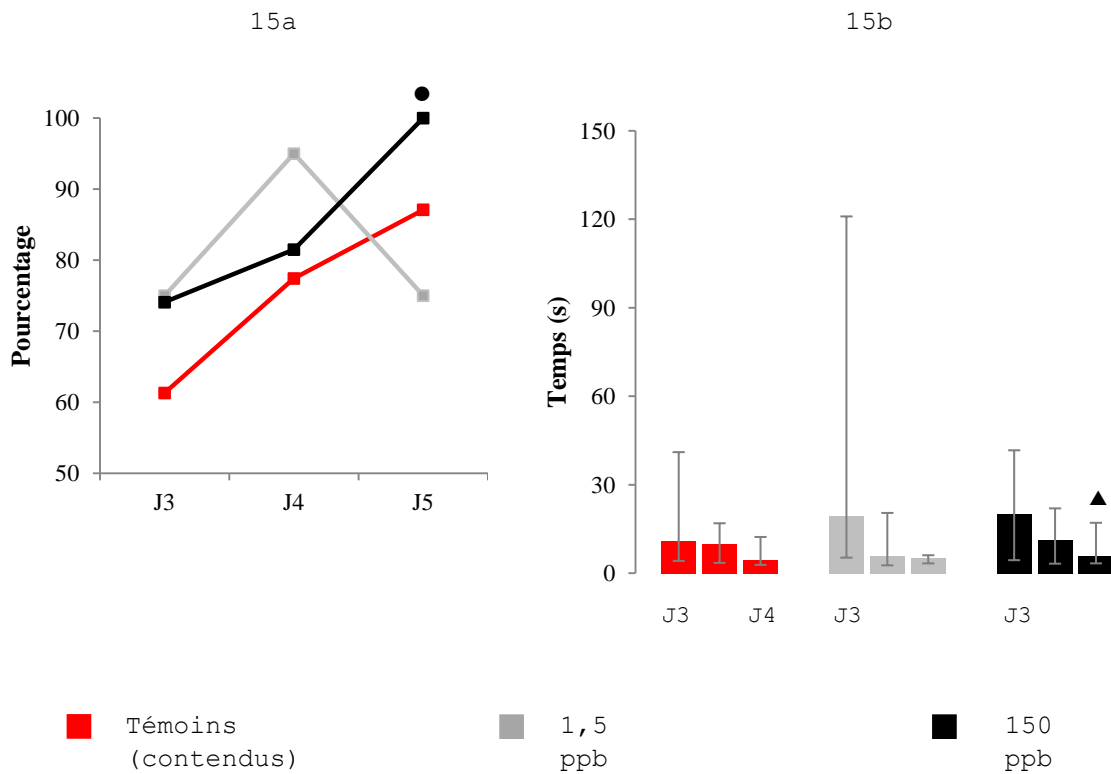
L'analyse des données relevées dans ce test n'a montré aucune variation significative entre les groupes concernant les pourcentages de réussite au test et la valeur de l'inclinaison atteinte par les animaux avant la chute au cours des trois jours de test (**Figures 16a et 16b**).

Par contre, une amélioration des performances des animaux des deux groupes exposés au fluorène au cours de la gestation a été observée au cours de la période de test (1,5 ppb : $F=7,3$; $p=0,026$, 150 ppb : $F=8,4$; $p=0,015$) (**Figure 16b**).

c. Cliff avoidance

Le test du χ^2 de Pearson a permis de révéler à PN6 une variation significative du pourcentage de réussite entre les groupes alors qu'il était comparable entre les groupes à PN5. Un plus grand nombre d'animaux exposés au fluorène au cours de la gestation a réussi ce test comparé aux témoins (**Figure 17a**). A PN7 en revanche, plus aucune différence entre les trois groupes n'a été détectée (**Figure 17a**). Par ailleurs, aucune variation du temps mis par les animaux pour reculer sur la plate-forme n'a été mise en évidence entre les trois groupes, quelque soit l'âge considéré (**Figure 17b**).

De PN5 à PN7, l'ensemble des animaux a néanmoins amélioré ses performances, le temps d'exécution du test diminuant significativement dans les trois groupes au cours de cette période



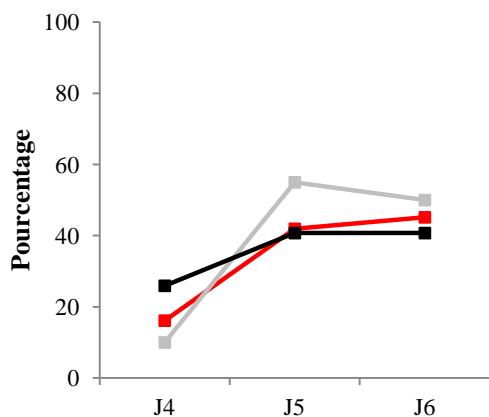
Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

● : $p < 0,05$ effets statistiquement significatifs

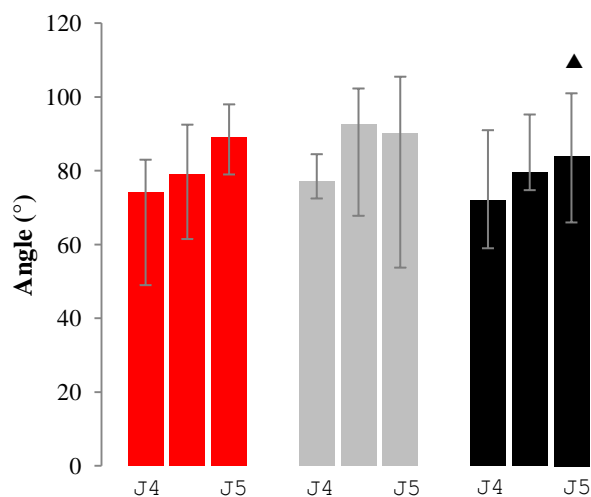
▲ : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

Figures 15a et 15b : Pourcentage de réussite au test de retournement (15a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb pour se retourner (médianes et quartiles) (15b)

16a



16b



■ Témoins
(contendus)

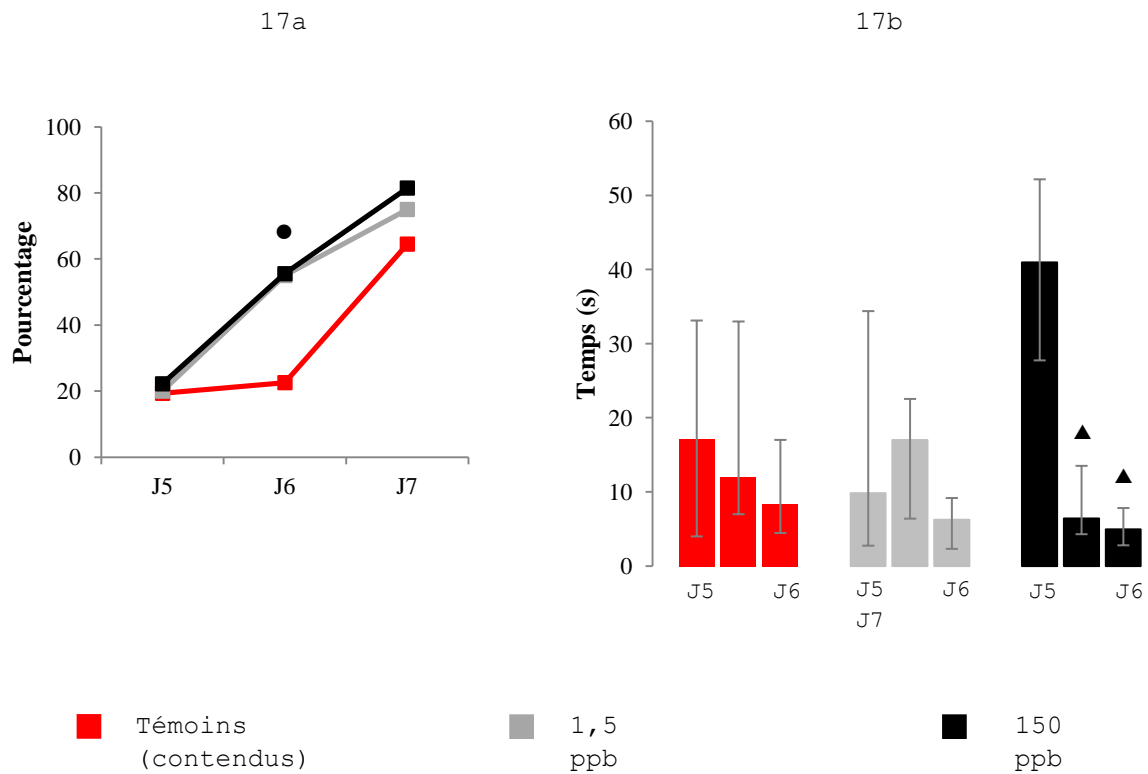
■ 1,5
ppb

■ 150
ppb

Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

▲ : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

Figures 16a et 16b : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (16a) et angle atteint par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles) (16b)



Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

● : $p < 0,05$ effets statistiquement significatifs

▲ : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

Figures 17a et 17b : Pourcentage de réussite au test du *cliff avoidance* (17a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (17b)

(Témoins (contendus) : $F=62,1$; $p=0,000$, 1,5 ppb : $F=41,0$; $p=0,000$, 150 ppb : $F=24,1$; $p=0,000$) (Figure 17b).

d. Réaction anti-gravitaire

L'analyse du pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire n'a révélé aucune différence entre les trois groupes au cours des trois jours de vie postnatale considérés (Figure 18a). En revanche, à PN10, une variation significative du temps d'exécution du test a été mise en évidence, montrant que les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène en période de gestation ont été plus rapides que les témoins à réaliser l'épreuve imposée par ce test ($U=9,6$; $p=0,008$) (Figure 18b).

De plus, des trois groupes étudiés, seuls les jeunes exposés à 1,5 ppb de fluorène ont significativement amélioré leur performance au cours des trois jours de test ($F=9,7$; $p=0,008$) (Figure 18b).

e. Test de suspension

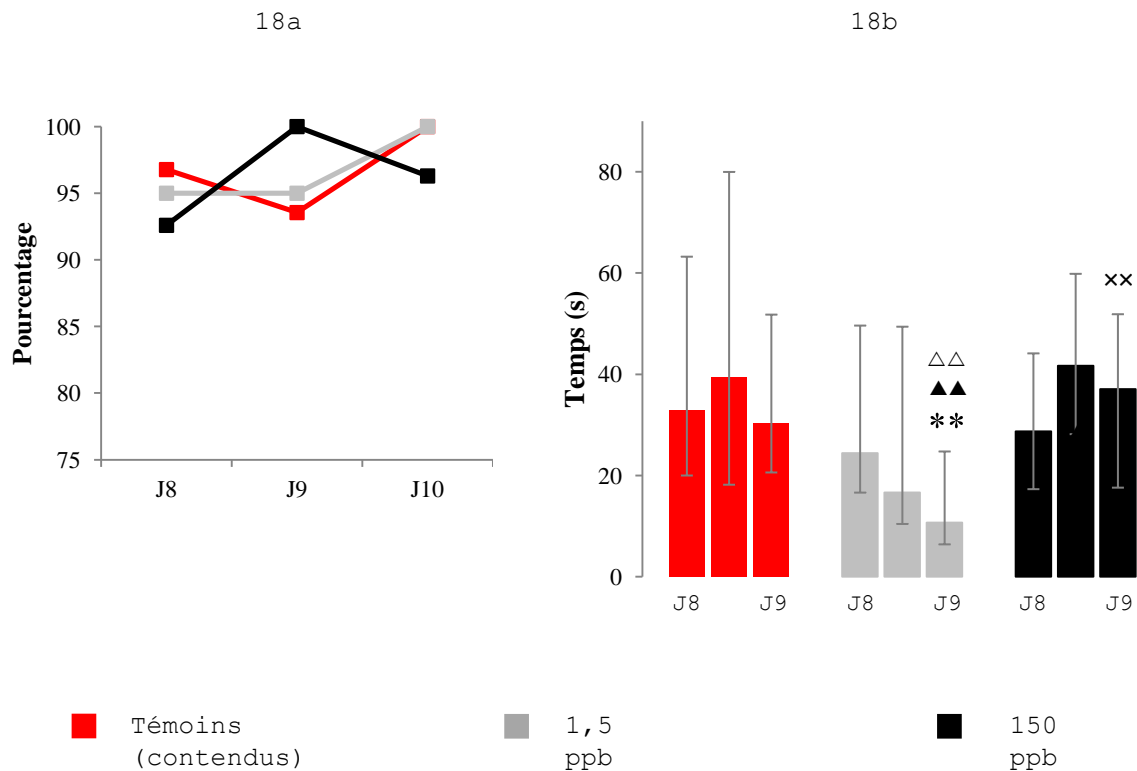
Aucune différence entre les groupes n'a été révélée par l'analyse des résultats obtenus à ce test (Figure 19).

f. Test du sursaut au bruit

L'analyse des pourcentages d'animaux réactifs à la stimulation sonore n'a montré aucune différence entre les trois groupes entre PN11 et PN15 (Figure 20).

g. Ouverture des yeux

L'observation du moment d'ouverture des yeux chez les jeunes rats a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les groupes à PN13, PN14 et PN15. En particulier, un plus grand nombre de jeunes exposés à 1,5 ppb de fluorène au cours de la gestation avait les yeux ouverts comparé aux témoins et aux animaux exposés à 150 ppb de fluorène au cours de ces trois jours de vie postnatale (Figure 21). A PN16, plus aucune différence n'a été observée entre les groupes (Figure 21).



Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Mann-Whitney et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

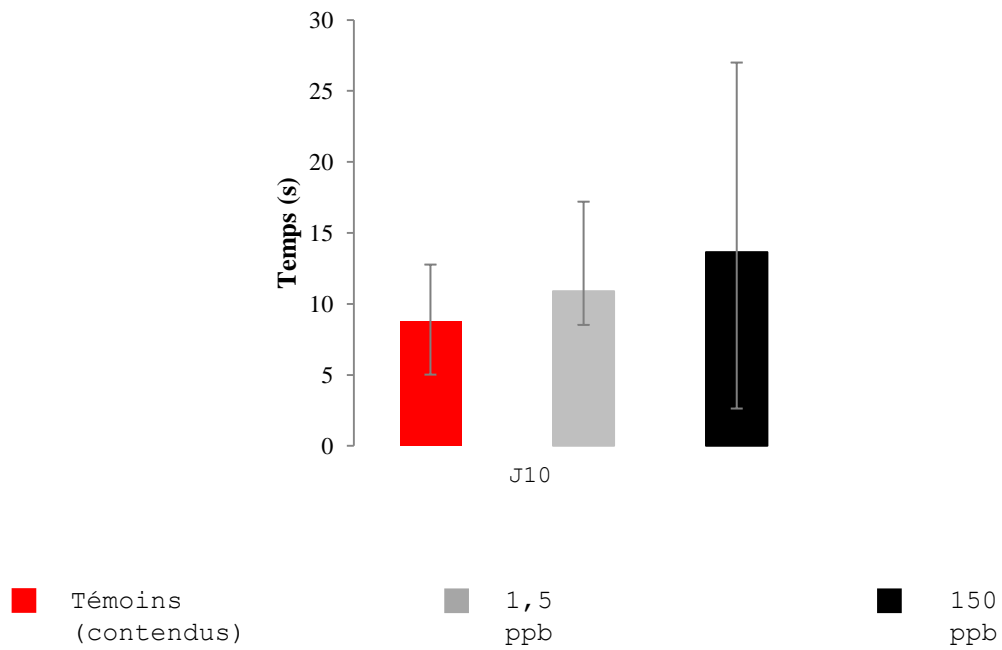
** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

xx : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux animaux exposés à 1,5 ppb

▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

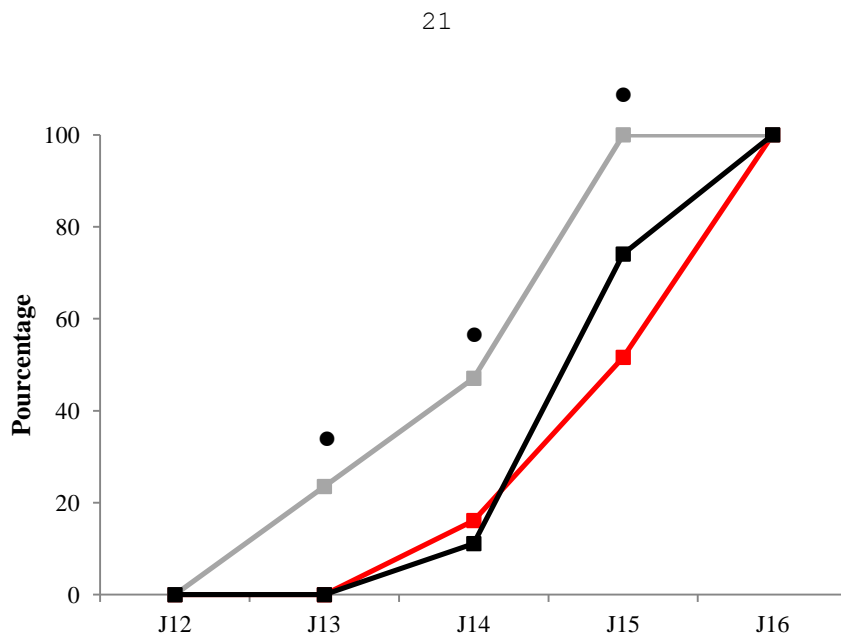
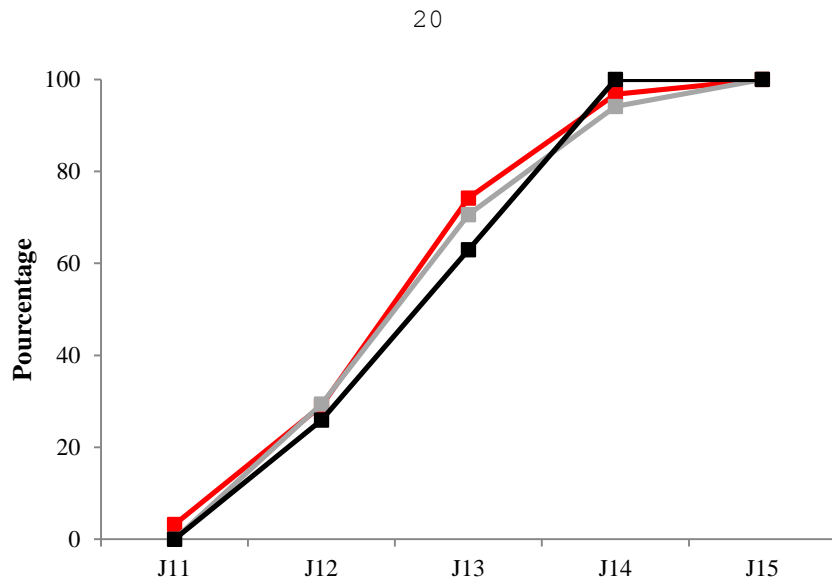
△△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

Figures 18a et 18b : Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (18a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (18b)



Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les animaux des trois groupes.

Figure 19 : Temps de suspension des animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles)



■ Témoins (contendus)
 ■ 1,5 ppb
 ■ 150 ppb

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des trois groupes.

● : $p < 0,05$ effets statistiquement significatifs

Figures 20 et 21 : Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN15 (20) et ayant les yeux ouverts entre PN12 et PN16 (21)

h. Test de coordination locomotrice

Les résultats ont montré une baisse significative du pourcentage de réussite au test des animaux exposés à 1,5 et 150 ppb de fluorène à PN20, sans qu'aucune évolution du temps de nage, d'escalade de la tige et de rétablissement sur la plate-forme, mesurés chez les animaux ayant réussi, n'ait été observée au cours des trois jours de test (**Tableau 33**). A PN21, le taux de réussite était équivalent entre les trois groupes, montrant qu'un déficit transitoire a été observé chez les animaux exposés au fluorène à PN20 (**Tableau 33**).

Par ailleurs, l'amélioration significative de l'ensemble des variables mesurées attestent du bon développement de la coordination locomotrice de l'ensemble des animaux au cours des trois jours de vie postnatale étudiés (**Tableau 33**).

i. Open-field

L'ANOVA à 1 facteur réalisée sur les données relevées dans l'OF a permis de mettre en évidence un effet de l'exposition prénatale au fluorène sur l'activité générale des animaux de 25 jours. Une augmentation significative du nombre total de cases traversées et du nombre total de redressements effectués a été observée chez les animaux exposés en période prénatale au fluorène par rapport aux témoins et ce aux deux concentrations étudiées (**Tableau 34**).

III.1.3.2. Comportement maternel

a. Construction du nid

L'analyse des observations faites à l'issue du test de construction du nid à PN3, PN6 et PN9 n'a montré aucune différence dans l'aptitude des mères des trois groupes expérimentaux à réaliser cette tâche (**Figures 22a, 22b et 22c**).

b. Ramassage des jeunes

Des événements indépendants des procédures mises en œuvre au laboratoire ayant conduit à la perte des données, aucune analyse des résultats concernant le test du ramassage des jeunes n'a été possible.

Tableau 33 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur le comportement du jeune rat dans le test de coordination locomotrice

	Témoins (contendus)			1,5 ppb			150 ppb		
	PN19	PN20	PN21	PN19	PN20	PN21	PN19	PN20	PN21
Temps de nage (s)	45,0 (33,0 - 52,0)	17,5 ▲▲ (12,5 - 29,5)	12,0 ▲▲△△ (8,0 - 15,0)	44,0 (31,0 - 62,0)	18,5 (11,0 - 43,3)	13,0 ▲△ (7,0 - 21,0)	60,0 (38,8 - 79,3)	15,0 ▲▲ (9,0 - 22,0)	11,0 ▲▲ (3,0 - 22,0)
Temps de grimpe (s)	15,0 (10,0 - 21,0)	9,0 ▲▲ (6,8 - 12,0)	6,0 ▲▲△ (5,0 - 9,0)	13,0 (8,0 - 18,0)	10,5 (7,8 - 15,4)	8,0 ▲△ (6,0 - 9,0)	17,5 (16,3 - 23,3)	10,0 ▲▲ (8,0 - 15,0)	7,0 ▲▲△ (5,0 - 9,0)
Temps de rétablissement sur la plate-forme (s)	12,0 (7,0 - 21,0)	10,0 ▲ (4,8 - 22,0)	6,0 ▲▲△△ (4,0 - 8,0)	11,0 (7,0 - 35,0)	10,5 (8,0 - 13,3)	4,0 ▲△△ (3,0 - 6,0)	18,0 (13,8 - 19,8)	8,0 ▲▲ (5,0 - 11,0)	5,0 ▲△△ (4,0 - 9,0)
Temps total (s)	73,0 (63,0 - 81,0)	43,0 ▲▲ (29,5 - 63,0)	26,0 ▲▲△△ (17,0 - 34,0)	83,0 (60,0 - 90,0)	43,0 (29,8 - 77,0)	24,0 ▲△△ (21,0 - 39,0)	95,0 (78,5 - 107,8)	34,0 ▲▲ (27,0 - 48,0)	25,0 ▲▲△△ (14,0 - 40,0)
Réussite (%)	48,4	96,8	100	41,2	82,4 ●	88,2	38,5	73,1 ●	88,5

Les résultats sont présentés sous forme de médianes, les rangs étant indiqués entre parenthèses, et de pourcentages moyens. Le Khi-deux de Pearson, le test de Mann-Whitney et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des deux groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

● : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contenus)

▲ : $p < 0,05$; ▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

△ : $p < 0,05$; △△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

Tableau 34 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25

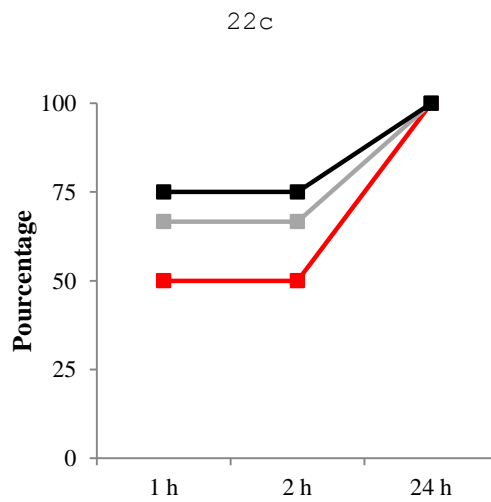
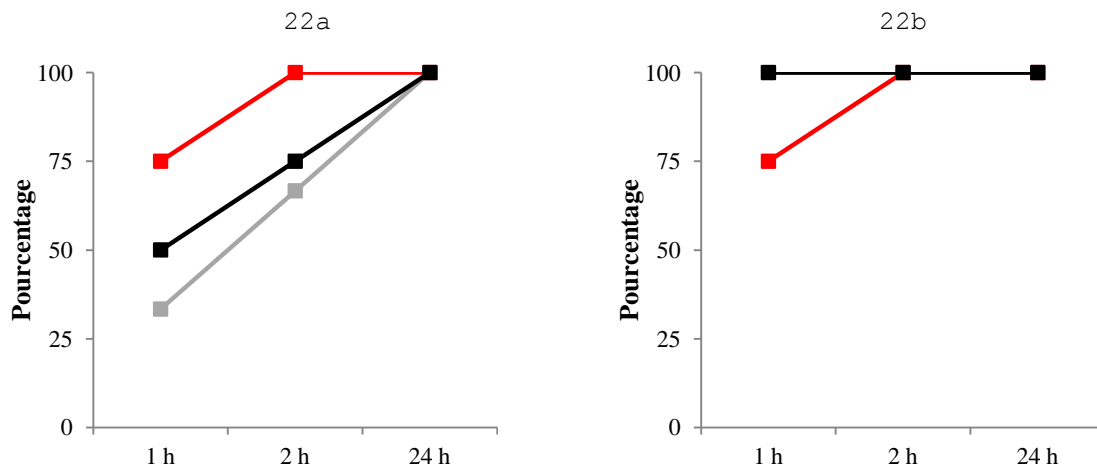
	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[2,71]	p
Temps en ZC (s)	12,1 ± 1,3	11,3 ± 2,5	15,0 ± 2,5	0,9	n.s.
Temps en ZI (s)	22,6 ± 2,4	22,3 ± 3,3	26,4 ± 2,5	0,7	n.s.
Temps en ZP (s)	265,0 ± 2,8	266,3 ± 5,0	258,6 ± 3,7	1,3	n.s.
Nombre total de cases traversées	99,1 ± 5,1	117,8 ± 4,7 *	124,5 ± 4,7 **	7,8	<0,01
Cases traversées en ZC (%)	4,8 ± 0,4	4,8 ± 0,7	4,2 ± 0,5	0,5	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	13,7 ± 1,0	14,2 ± 1,5	14,3 ± 1,2	0,1	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	81,2 ± 1,2	80,7 ± 2,1	81,3 ± 1,6	0,0	n.s.
Nombre total de redressements	26,5 ± 2,4	36,1 ± 3,8 *	34,9 ± 2,3 *	3,9	<0,05
Redressements en ZP (%)	92,1 ± 1,3	86,2 ± 2,7	88,6 ± 1,7	2,7	p=0,074

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (contendus)

n.s. : non significatif

Abréviations: ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique



■ Témoins (contendus)
 ■ 1,5 ppb
 ■ 150 ppb

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

Figures 22a, 22b et 22c : Pourcentage de mères des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb ayant construit un nid à PN3 (22a), PN6 (22b) et PN9 (22c)

III.1.3.3. Poids corporel

De même, les relevés du poids corporel des animaux ne peuvent pas être présentés.

III.1.3.4. Tests à l'âge adulte

a. Labyrinthe en croix surélevé

Dans ce labyrinthe, les animaux des deux groupes exposés au fluorène ont significativement passé moins de temps en BF, effectué plus de passages en ZC et visité un plus grand nombre de branches par rapport aux témoins (**Tableau 35**). Concernant les BO, seuls les rats exposés à 1,5 ppb de fluorène en période prénatale ont passé plus de temps et effectué un plus grand nombre d'entrées dans ces branches comparé aux témoins (**Tableau 35**).

L'ANOVA à 2 facteurs a par ailleurs permis de mettre en évidence un effet du sexe sur le comportement des animaux dans ce test, montrant un degré d'activité plus important chez les femelles que chez les mâles (**Tableau 35**). Ainsi, les femelles ont effectué un plus grand nombre d'entrées en BO et en BF, et un plus grand nombre de passages dans la ZC qui sont significativement plus importants que ceux mesurés chez les mâles (**Tableau 35**). De plus, elles ont effectué significativement plus de redressements et de *head-dipping*, les femelles ayant tendance à effectuer plus de *head-dipping* en BO que dans la ZC comparé aux mâles (**Tableau 35**).

Enfin, aucune interaction entre ces deux facteurs n'a été mise en évidence quelque soit les variables étudiées (**Tableau 35**).

b. Open-field

Aucune variation significative de l'activité générale des animaux, reflétée par le nombre total de cases traversées, n'a été observée entre les trois groupes d'animaux. Par contre, les animaux exposés en période prénatale à 1,5 ppb de fluorène ont passé significativement plus de temps dans la ZC et la ZI, et moins de temps dans la ZP comparé aux rats témoins, indiquant une modification du niveau d'anxiété de ces animaux (**Tableau 36**). Ces animaux ont également effectué plus de redressements dans la ZC et ZI au détriment de la ZP (**Tableau 36**). Enfin, aucune variation significative du comportement des rats exposés au cours de la gestation à 150 ppb de fluorène n'a été mise en évidence par l'analyse statistique des données (**Tableau 36**).

Par ailleurs, le sexe a eu une influence sur le comportement des animaux observé dans ce test (**Tableau 36**). Les femelles ont ainsi montré une tendance à traverser plus de cases au cours de la période

Tableau 35 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Entrées en BO	5,8 ± 0,6	8,3 ± 0,6	7,6 ± 0,7 **	10,5 ± 0,7 **	6,9 ± 0,6	8,7 ± 0,6	4,7	<0,05	20,2	<0,01	0,4	n.s.
Entrées en BF	6,7 ± 0,6	7,9 ± 0,6	6,3 ± 0,7	8,4 ± 0,7	7,1 ± 0,6	8,5 ± 0,6	0,4	n.s.	9,0	<0,01	0,2	n.s.
Nombre de passages en ZC	12,5 ± 0,8	15,5 ± 0,8	14,0 ± 0,9 **	19,0 ± 0,9 **	14,3 ± 0,8 *	17,3 ± 0,8 *	4,7	<0,05	29,6	<0,01	0,8	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	46,5 ± 2,9	50,6 ± 2,9	54,8 ± 3,5	55,8 ± 3,5	48,4 ± 2,9	51,2 ± 2,9	2,4	n.s.	1,1	n.s.	0,1	n.s.
Nombre total d'entrées	12,4 ± 0,8	15,3 ± 0,8	13,9 ± 0,9 **	18,9 ± 0,9 **	14,0 ± 0,8 *	17,2 ± 0,8 *	4,9	<0,05	29,9	<0,01	0,9	n.s.
Temps en BO (s)	100,6 ± 9,1	115,6 ± 9,1	131,1 ± 11,1 *	135,9 ± 11,1 *	121,7 ± 9,1	125,1 ± 9,1	3,3	<0,05	0,9	n.s.	0,2	n.s.
Temps en BF (s)	136,3 ± 8,7	119,8 ± 8,7	103,0 ± 10,6 *	101,3 ± 10,6 *	109,3 ± 8,7 ^a	110,5 ± 8,7 ^a	4,1	<0,05	0,5	n.s.	0,6	n.s.
Temps en ZC (s)	63,1 ± 5,1	64,5 ± 5,1	65,9 ± 6,3	62,8 ± 6,3	69,0 ± 5,1	64,5 ± 5,1	0,2	n.s.	0,2	n.s.	0,2	n.s.
Nombre total de redressements	15,4 ± 2,1	23,6 ± 2,1	17,6 ± 2,6	18,0 ± 2,6	15,1 ± 2,1	19,0 ± 2,1	0,7	n.s.	5,0	<0,05	1,4	n.s.
Redressements en BF (%)	80,5 ± 4,6	81,5 ± 4,6	75,8 ± 5,6	79,9 ± 5,6	82,5 ± 4,6	84,2 ± 4,6	0,6	n.s.	0,3	n.s.	0,0	n.s.
Nombre total de head dipping	9,3 ± 1,5	14,5 ± 1,5	10,0 ± 1,8	17,8 ± 1,8	11,9 ± 1,5	15,2 ± 1,5	1,0	n.s.	17,7	<0,01	1,0	n.s.
Head dipping en BO (%)	68,8 ± 3,8	84,2 ± 3,8	81,1 ± 4,7	82,9 ± 4,7	77,4 ± 3,8	78,5 ± 3,8	0,8	n.s.	3,3	p=0,076	2,1	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test a posteriori de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : p=0,074

* : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

Tableau 36 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Temps en ZC (s)	12,3 ± 1,6	10,9 ± 1,6	18,8 ± 2,0 **	15,9 ± 2,1 **	11,2 ± 1,7	17,1 ± 1,7	4,6	<0,05	0,1	n.s.	3,4	<0,05
Temps en ZI (s)	28,6 ± 5,1	30,3 ± 5,1	36,7 ± 4,9 *	45,0 ± 5,2 *	23,6 ± 4,2	39,9 ± 4,2	3,2	<0,05	5,7	<0,05	1,5	n.s.
Temps en ZP (s)	259,1 ± 6,1	258,8 ± 6,1	244,4 ± 6,1 **	239,1 ± 6,4 **	265,3 ± 5,3	243,0 ± 5,3	4,5	<0,05	4,1	<0,05	2,3	n.s.
Nombre total de cases traversées	155,8 ± 9,9	173,0 ± 9,9	180,0 ± 12,6	194,5 ± 13,3	168,1 ± 10,9	191,3 ± 10,9	2,0	n.s.	3,7	p=0,058	0,1	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	4,9 ± 0,7	4,8 ± 0,7	6,4 ± 0,7	6,1 ± 0,8	4,4 ± 0,6	7,2 ± 0,6	2,2	n.s.	2,1	n.s.	3,4	<0,05
Cases traversées en ZI (%)	13,3 ± 1,8	17,6 ± 1,8	17,7 ± 1,9	19,0 ± 2,0	11,9 ± 1,7	18,9 ± 1,7	1,7	n.s.	8,5	<0,01	1,2	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	81,8 ± 2,3	77,6 ± 2,3	76,0 ± 2,4	74,9 ± 2,6	83,7 ± 2,1	74,0 ± 2,1	1,8	n.s.	7,5	<0,01	1,9	n.s.
Nombre total de redressements	25,5 ± 3,7	32,5 ± 3,7	35,3 ± 4,1 *	43,4 ± 4,3 *	24,3 ± 3,5	36,8 ± 3,5	4,0	<0,05	9,0	<0,01	0,3	n.s.
Redressements en ZP (%)	93,0 ± 2,1	91,4 ± 2,1	91,2 ± 2,6 **	77,8 ± 2,7 **	97,1 ± 2,2	90,6 ± 2,2	7,9	<0,01	13,8	<0,01	2,9	p=0,06

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test a posteriori de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

de test que les mâles (**Tableau 36**). Par rapport aux différentes zones du labyrinthe, elles ont passé significativement plus de temps dans la ZI et moins de temps dans la ZP que les mâles (**Tableau 36**). De plus, un pourcentage significativement plus important de cases traversées dans la ZI et à l'inverse significativement plus faible de cases traversées dans la ZP a été observé (**Tableau 36**). Enfin, les femelles ont effectué plus de redressements et montré un pourcentage de redressements dans la ZP plus faible que celui des mâles (**Tableau 36**).

Une interaction entre les deux facteurs testés a par ailleurs été mise en évidence (**Tableau 36**). Ainsi, les mâles exposés à 150 ppb de fluorène en période prénatale ont traversé moins de cases et passé moins de temps en ZC comparé aux femelles exposées à la même concentration (**Tableau 36**). De plus, un pourcentage plus faible de redressements dans la ZP a été observé chez les femelles exposées à 1,5 ppb comparé aux mâles du même groupe (**Tableau 36**).

c. Boîte claire/obscur

L'analyse des données relevées à l'issue du test de la boîte claire/obscur n'a révélé aucune différence significative entre les animaux des trois groupes (**Tableau 37**).

Par contre, des variations liées au sexe des animaux ont été détectées (**Tableau 37**). Comparé aux mâles, les femelles sont sorties plus rapidement dans le CC et y ont passé plus de temps (**Tableau 37**). Elles ont également effectué plus d'alternances entre les deux compartiments et plus de redressements dans le CC comparé aux mâles, toutes ces différences étant significatives (**Tableau 37**).

Une interaction entre les facteurs liés à l'exposition au fluorène et au sexe a également été observée, les femelles à la plus faible concentration de fluorène ayant passé moins de temps et effectué moins de redressements dans le CC que les femelles témoins (**Tableau 37**).

d. Labyrinthe en Y

L'ANOVA à 2 facteurs n'a montré aucune influence de l'exposition au fluorène sur le comportement des animaux observé dans ce test, alors qu'un effet du sexe a été mis en évidence mais uniquement au niveau du nombre de redressements (**Tableau 38**).

Enfin, une interaction entre ces deux facteurs a été détectée concernant le pourcentage d'alternance spontanée (**Tableau 38**). Un pourcentage plus faible d'alternance a ainsi été observé chez les mâles exposés à 150 ppb au cours de la gestation comparé à ceux des autres groupes, tandis qu'aucune variation n'a été observée entre les femelles des trois groupes (**Tableau 38**).

Tableau 37 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Temps de 1 ^{re} sortie dans le CC (s)	65,2 ± 10,0	37,2 ± 10,5	39,6 ± 11,7	43,9 ± 11,7	78,4 ± 10,5	34,2 ± 9,6	0,9	n.s.	6,7	<0,05	2,5	n.s.
Temps dans le CC (s)	55,7 ± 8,8	111,0 ± 9,2	99,3 ± 10,3	102,0 ± 10,3	64,6 ± 9,2	124,8 ± 8,4	1,7	n.s.	26,5	<0,01	5,3	<0,01
Nombre d'alternances	7,2 ± 1,1	12,0 ± 1,2	10,4 ± 1,3	11,8 ± 1,3	7,7 ± 1,2	13,3 ± 1,1	0,7	n.s.	16,0	<0,01	1,6	n.s.
Tentatives d'entrées dans le CC	4,5 ± 0,7	3,9 ± 0,8	3,0 ± 0,9	4,5 ± 0,9	4,1 ± 0,8	3,7 ± 0,7	0,1	n.s.	0,1	n.s.	1,0	n.s.
Redressements	5,5 ± 1,4	16,8 ± 1,4	11,5 ± 1,6	15,6 ± 1,6	6,8 ± 1,4	18,1 ± 1,3	1,3	n.s.	55,1	<0,01	3,6	<0,05

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviation : CC, compartiment clair

Tableau 38 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Alternance spontanée (%)	65,4 ± 2,5	60,9 ± 2,5	68,3 ± 2,9	61,2 ± 3,0	61,3 ± 2,5	65,8 ± 2,5	0,2	n.s.	1,2	n.s.	2,7	p=0,072
Nombre total de branches visitées	29,3 ± 3,3	38,8 ± 3,3	37,8 ± 3,8	39,4 ± 4,0	38,4 ± 3,3	37,8 ± 3,3	1,0	n.s.	1,5	n.s.	1,3	n.s.
Nombre de branches visitées (1 ^{ère})	3,8 ± 0,4	4,9 ± 0,4	5,0 ± 0,5	4,9 ± 0,5	4,9 ± 0,4	4,9 ± 0,4	1,0	n.s.	0,7	n.s.	1,0	n.s.
Redressements	74,3 ± 3,5	82,8 ± 3,5	84,2 ± 4,1	88,6 ± 4,3	74,3 ± 3,5	87,3 ± 3,5	2,1	n.s.	8,0	<0,01	0,6	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

e. *Labyrinthe radial à 8 branches*

L'ANOVA à 3 facteurs réalisée sur les données relevées au cours de 10 jours de test dans le labyrinthe radial à 8 branches a révélé un effet de l'exposition au fluorène sur le nombre de branches visitées par minute (**Tableau 39**). Comparé aux témoins, des augmentations significatives, ou tendant à l'être, du nombre de branches visitées par minute ont été observées chez les animaux exposés *in utero* à 1,5 et 150 ppb de fluorène (**Tableau 39**). De plus, une tendance à un effet du groupe sur le temps d'exécution du test a été observée, montrant que les rats exposés à 150 ppb de fluorène ont réalisé plus rapidement le test que les animaux des deux autres groupes (**Tableau 39**).

En revanche, aucun effet du sexe, ainsi qu'aucune interaction entre l'exposition au fluorène et le sexe, n'a été mis en évidence (**Tableau 39**).

Par ailleurs, l'analyse statistique a montré un effet du jour de test sur l'ensemble des variables relevées au cours des dix séances (**Tableau 39**). Les animaux des trois groupes ont ainsi amélioré de manière significative leurs performances, reflété par une diminution du nombre de branches visitées et donc du nombre d'erreurs effectuées, une réduction du temps d'exécution du test et des augmentations significatives du nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur et du nombre de branches visitées par minute (**Tableau 39**).

De plus, un effet de l'interaction entre le sexe et le jour de test a été observé concernant le temps d'exécution du test, le nombre de branches visitées par minute et le nombre total de branches visitées (**Tableau 39**), montrant que les femelles ont été plus actives que les mâles sur la période de test. Un effet de l'interaction entre le groupe d'exposition et le jour de test a également été observé sur le nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur, indiquant que les animaux exposés *in utero* au fluorène ont commis plus rapidement une erreur comparé aux témoins (**Tableau 39**).

Enfin, l'analyse statistique a montré que ces trois facteurs (groupe, sexe, jour de test) ont interagité entre eux (**Tableau 39**).

Tableau 39 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches

	Jour 1		Jour 4		Jour 7		Jour 10	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Temps total (s)								
Témoins (contendus)	87,2 ± 8,0	77,4 ± 8,4	64,1 ± 8,1	51,8 ± 8,5	52,8 ± 7,1	48,5 ± 7,4	38,2 ± 4,3	34,8 ± 4,5
1,5 pbb	72,7 ± 13,1	119,5 ± 13,9	52,9 ± 9,0	74,8 ± 9,5	33,8 ± 7,7	47,6 ± 8,2	45,6 ± 6,2	34,4 ± 6,6
150 ppb	69,2 ± 11,8	69,3 ± 11,3	41,1 ± 8,1	55,9 ± 7,8	33,2 ± 7,0	47,6 ± 6,7	38,8 ± 5,6	33,6 ± 5,4
Nombre total de branches visitées								
Témoins (contendus)	12,6 ± 0,7	11,6 ± 0,7	11,9 ± 0,8	10,5 ± 0,8	10,1 ± 0,8	10,8 ± 0,8	9,6 ± 0,5	8,8 ± 0,5
1,5 pbb	11,8 ± 0,9	16,4 ± 1,0	11,3 ± 1,2	14,0 ± 1,3	9,8 ± 1,0	10,8 ± 1,1	11,0 ± 0,7	9,0 ± 0,7
150 ppb	12,2 ± 0,8	11,1 ± 0,8	9,8 ± 1,1	12,8 ± 1,0	8,9 ± 0,9	11,8 ± 0,9	9,9 ± 0,6	8,9 ± 0,6
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur								
Témoins (contendus)	5,0 ± 0,5	4,6 ± 0,5	6,2 ± 0,5	6,4 ± 0,5	6,6 ± 0,4	7,0 ± 0,4	6,3 ± 0,4	7,5 ± 0,4
1,5 pbb	4,8 ± 0,6	4,9 ± 0,6	6,7 ± 0,5	5,6 ± 0,5	6,6 ± 0,6	5,5 ± 0,6	6,8 ± 0,4	7,4 ± 0,4
150 ppb	5,6 ± 0,5	5,5 ± 0,5	6,1 ± 0,4	5,0 ± 0,4	6,0 ± 0,5	5,9 ± 0,5	7,0 ± 0,4	7,2 ± 0,4
Nombre de branches visitées / min								
Témoins (contendus)	9,2 ± 8,6	9,8 ± 0,9	11,8 ± 1,0	13,1 ± 1,0	12,8 ± 1,4	13,9 ± 1,4	17,3 ± 1,5	16,6 ± 1,5
1,5 pbb	10,4 ± 1,0 ^a	9,3 ± 1,0 ^a	15,6 ± 1,2 ^a	12,4 ± 1,3 ^a	17,4 ± 1,6 ^a	14,1 ± 1,7 ^a	16,7 ± 1,8 ^a	16,4 ± 1,9 ^a
150 ppb	11,3 ± 0,9 ^{**}	11,5 ± 0,8 ^{**}	15,0 ± 1,1 ^{**}	14,8 ± 1,0 ^{**}	18,5 ± 1,5 ^{**}	16,5 ± 1,4 ^{**}	17,9 ± 1,6 ^{**}	17,7 ± 1,6 ^{**}

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. ^a : p=0,065, * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 effet statistiquement significatif du Groupe

	Groupe		Sexe		Jour de test		Groupe × Sexe		Groupe × Jour		Sexe × Jour		Groupe × Sexe × Jour	
	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Temps total (s)	2,8	p=0,067	0,4	n.s.	18,6	<0,01	2,3	n.s.	1,3	n.s.	1,9	<0,05	1,1	n.s.
Nombre total de branches visitées	0,5	n.s.	1,3	n.s.	8,6	<0,01	1,3	n.s.	1,0	n.s.	1,7	p=0,09	1,7	<0,05
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur	0,3	n.s.	0,8	n.s.	15,0	<0,01	1,2	n.s.	1,8	<0,05	1,5	n.s.	1,4	n.s.
Nombre de branches visitées / min	5,6	<0,01	0,1	n.s.	22,9	<0,01	0,9	n.s.	1,3	n.s.	2,1	<0,05	0,6	n.s.

Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

III.1.4. Effets du stress de contention

III.1.4.1. Tests neurodéveloppementaux

Dans le test de retournement, il est apparu qu'un nombre moins important de jeunes nés de femelles contendues ont réussi à se retourner comparés aux jeunes nés de femelles libres de se mouvoir à PN3. A PN4 et PN5, ces animaux ont également mis plus de temps que les jeunes du groupe Témoins (non contendus) à se retourner (PN4 : $U=150,5$; $p=0,008$, PN5 : $U=242$; $p=0,052$) (Tableau 40). Au plan de l'évolution de ce réflexe, les animaux nés de mères libres de se mouvoir ont montré une amélioration significative de leurs performances ($F=14,1$; $p=0,001$) (Tableau 40). Une amélioration a aussi été observée chez les animaux placés en contention mais elle n'était pas significative ($F=1,1$; $p=0,584$) (Tableau 40).

Les résultats du test d'agrippement n'ont montré aucune différence entre les rats des deux groupes (Tableau 40). Par ailleurs, seule une amélioration significative des performances des animaux du groupe Témoins (non contendus) a été observée au cours des trois jours de test ($F=8,9$; $p=0,012$) (Tableau 40).

Dans le test du *cliff avoidance*, le pourcentage de réussite au test était comparable entre les deux groupes à PN5 et PN6 et est devenu significativement plus faible chez les jeunes nés de mères contendues à PN7 (Tableau 40). Ces animaux ont également mis plus de temps pour reculer sur la plateforme lors des trois jours de test mais cette différence n'était significative qu'à PN7 (Tableau 40). Pour autant, le test de Friedman a montré une amélioration significative des performances des animaux des deux groupes au cours des trois jours de test (Témoins (non contendus) : $F=90,0$; $p=0,000$; Témoins (contendus) : $F=62,1$, $p=0,000$) (Tableau 40).

Dans le test de la réaction anti-gravitaire, les pourcentages de réussite ont été comparables entre les deux groupes d'animaux à chacun des jours de test (Tableau 40). Par ailleurs, les jeunes nés de mères contendues ont significativement mis plus de temps à effectuer la rotation que les rats nés de femelles libres de se mouvoir à PN9 et PN10 (PN9 : $U=210$; $p=0,002$, PN10 : $U=247,5$; $p=0,013$) (Tableau 40).

Dans le test de suspension, les jeunes nés de mères contendues ont montré une tendance statistique à rester moins longtemps suspendus que les animaux nés de mères libres de se mouvoir ($U=317$; $p=0,076$) (Tableau 40).

Dans le test de coordination locomotrice, le pourcentage d'animaux ayant réussi le test a été le même dans les deux groupes quelque soit l'âge de réalisation du test (Tableau 40). Les animaux nés de femelles contendues ont, à PN19, mis moins de temps et à PN21, mis plus de temps, que les rats nés de femelles non contendues pour réaliser le test (PN19 : $U=45$; $p=0,009$, PN21 : $U=273$; $p=0,014$)

Tableau 40 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur le développement neuromoteur du jeune rat

	Témoins (non contenus)			Témoins (contendus)		
	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour
Retournement						
temps (s)	8,5 (3,8 - 24,0)	3,2 ^{▲▲} (2,2 - 10,4)	3,5 [▲] (2,4 - 8,9)	12,2 (4,5 - 46,4)	11,9 ^{**} (3,7 - 21,5)	5,1 ^a (2,9 - 16,8)
réussite (%)	89,3	82,1	96,4	61,3 [●]	77,4	87,1
Agrippement						
angle (°)	78,5 (67,5 - 85,0)	82,0 (63,0 - 96,5)	94,0 ^{▲▲} (80,0 - 105,8)	74,0 (49,0 - 83,0)	83,0 (62,0 - 94,0)	89,0 (75,0 - 98,0)
réussite (%)	7,1	35,7	60,7	16,1	41,9	45,2
Cliff avoidance						
temps (s)	10,2 (2,0 - 28,0)	7,7 (3,8 - 21,3)	4,9 [△] (2,9 - 10,4)	17,1 (4,0 - 33,1)	12,0 (7,0 - 33,0)	8,3 [*] (4,5 - 17,0)
réussite (%)	7,1	35,7	60,7	16,1	41,9	45,2 ^{●●}
Réaction anti-gravitaire						
temps (s)	25,3 (13,7 - 59,8)	15,3 (10,5 - 34,1)	14,9 (8,0 - 30,6)	32,8 (20,0 - 63,3)	39,3 ^{**} (18,2 - 80,0)	30,3 [*] (20,6 - 51,8)
réussite (%)	96,4	100	92,9	96,8	93,5	100
Suspension						
temps (s)		13,1 (6,3 - 16,2)			8,8 ^b (5,0 - 12,8)	
Coordination locomotrice						
temps de nage (s)	52,5 (38,8 - 62,8)	19,5 ^{▲▲} (12,5 - 33,8)	6,5 ^{▲▲△△} (2,3 - 11,8)	45,0 (33,0 - 52,0)	17,5 ^{▲▲} (12,5 - 29,5)	12,0 ^{**▲▲△△} (8,0 - 15,0)
temps de grimpe (s)	11,0 (8,5 - 12,8)	8,0 ^{▲▲} (7,0 - 11,0)	6,0 ^{▲▲△} (5,0 - 8,8)	15,0 [*] (10,0 - 21,0)	9,0 ^{▲▲} (6,8 - 12,0)	6,0 ^{▲▲△} (5,0 - 9,0)
temps de rétablissement sur la plate-forme (s)	29,5 (14,8 - 52,3)	9,0 ^{▲▲} (5,0 - 12,0)	4,0 ^{▲▲△△} (3,0 - 6,0)	12,0 [*] (7,0 - 21,0)	10,0 [▲] (4,8 - 22,0)	6,0 ^{c▲▲△△} (4,0 - 8,0)
temps total (s)	96,0 (84,8 - 124,0)	38,0 ^{▲▲} (26,0 - 59,0)	17,0 ^{▲▲△△} (13,0 - 28,8)	73,0 ^{**} (63,0 - 81,0)	43,0 ^{▲▲} (29,5 - 63,0)	26,0 ^{*▲▲△△} (17,0 - 34,0)
réussite (%)	50,0	100	100	48,4	96,8	100

Les résultats sont présentés sous forme de médianes, les rangs étant indiqués entre parenthèses, et de pourcentages moyens. Le Khi-deux de Pearson, le test de Mann-Whitney et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des deux groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : p=0,052 ; ^b : p=0,076 ; ^c : p=0,054

* : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contenus)

● : p < 0,05 ; ●● : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contenus)

▲ : p < 0,05 ; ▲▲ : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

△ : p < 0,05 ; △△ : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

(Tableau 40). Concernant les différentes phases de ce test, les jeunes nés de mères contentues ont significativement mis plus de temps à grimper le long de la tige ($U=59$; $p=0,044$), mais ont été plus rapides à se rétablir sur la plate-forme à PN19 ($U=56,5$; $p=0,034$) (Tableau 40). Par contre, à PN21, ces mêmes animaux ont été plus lents à trouver la tige ($U=258$; $p=0,007$) et à se rétablir sur la plate-forme ($U=308$; $p=0,054$) (Tableau 40). Enfin, une amélioration significative des performances globales des animaux des deux groupes a été observée au cours de la période de test (Témoins (non contentus) : $F=23,3$; $p=0,000$; Témoins (contentus) : $F=18,5$, $p=0,000$) (Tableau 40).

Au plan de la maturation sensorielle, les deux groupes d'animaux ont montré une évolution de la sensibilité au bruit comparable à l'exception d'une baisse du nombre de jeunes nés de mères contentues à PN13, baisse à la limite de la significativité ($p=0,057$) (Figure 23).

Par ailleurs, les rats nés de femelles placées en contention ont montré un retard significatif de l'ouverture des yeux par rapport aux jeunes nés de mères libres de se mouvoir à PN14 et PN15 (Figure 24). Pour autant, tous les jeunes ont eu les yeux ouverts à PN16 (Figure 24).

Dans le test de l'OF réalisé à PN25, une diminution significative du nombre total de cases traversées a été observée chez les animaux nés de femelles contentues comparé aux rats nés de femelles libres de se mouvoir (Tableau 33). Parmi les autres variables mesurées, seul un pourcentage significativement plus important de redressements effectués dans la ZP a été également observé chez ces animaux (Tableau 41).

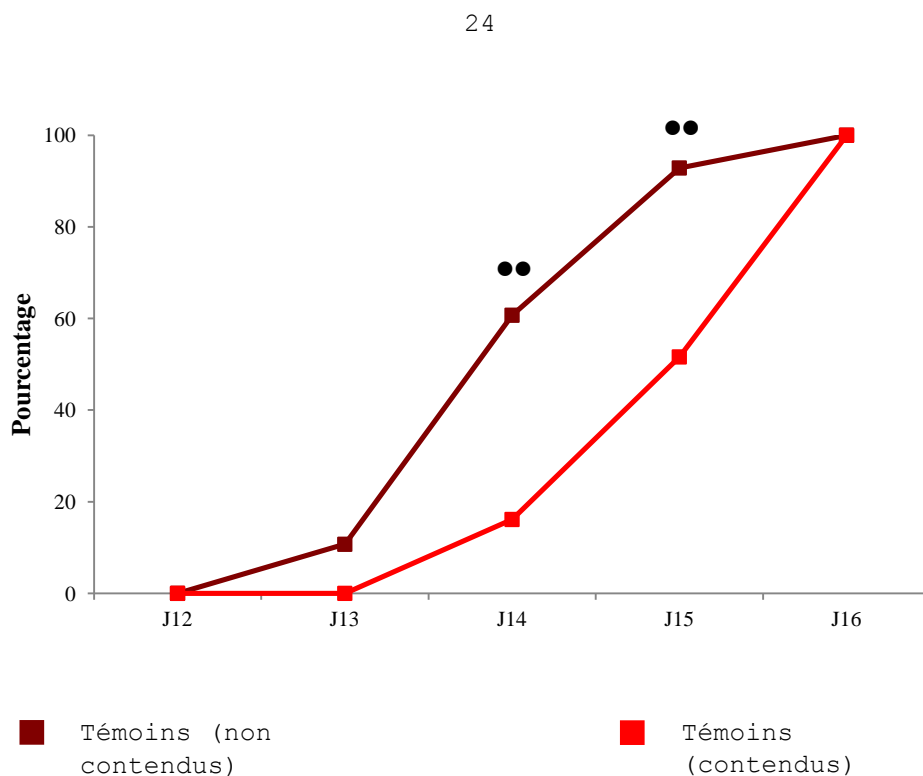
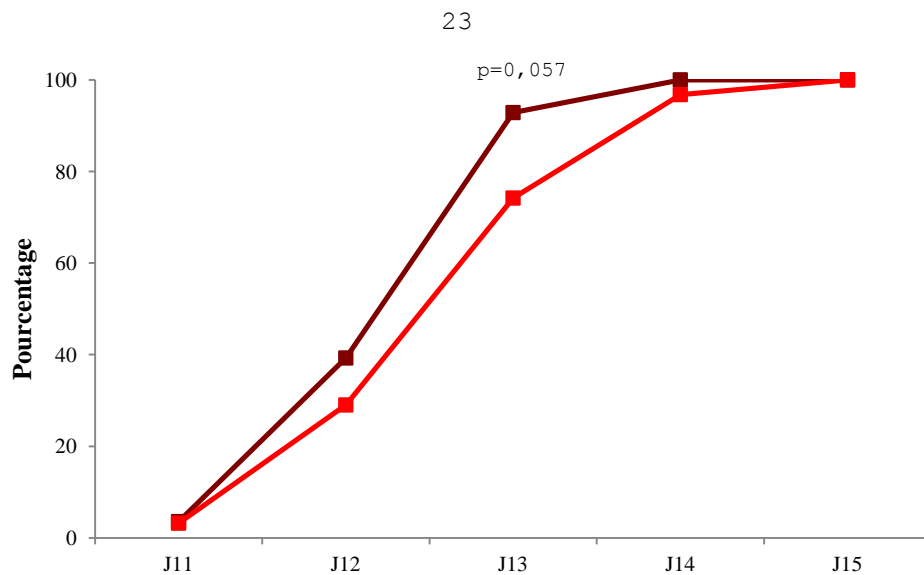
III.1.4.2. Comportement maternel

Aucun effet de la contention subie au cours de la gestation n'a été observé sur le comportement maternel de construction du nid après comparaison des résultats obtenus à PN3, PN6 et PN9 dans les deux groupes (Figures 25a, 25b et 25c).

Les enregistrements du test du ramassage des jeunes ayant été perdus, les données n'ont pu être traitées et les résultats ne peuvent être présentés.

III.1.4.3. Poids corporel

L'évolution de la croissance corporelle des animaux des deux groupes ne peut de même être présentée du fait de la perte des données.



Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des trois groupes.

•• : $p < 0,01$ effets statistiquement significatifs

Figures 23 et 24 : Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN15 (23) et ayant les yeux ouverts entre PN12 et PN16 (24)

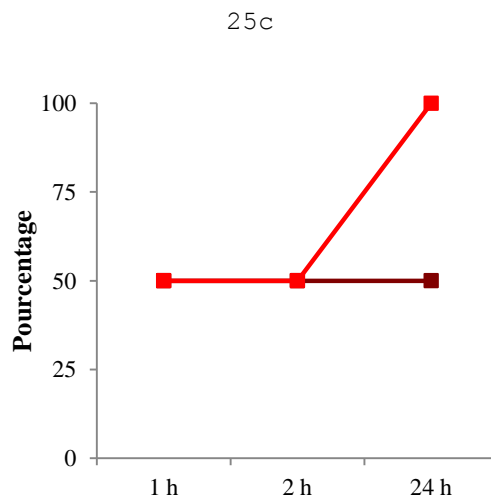
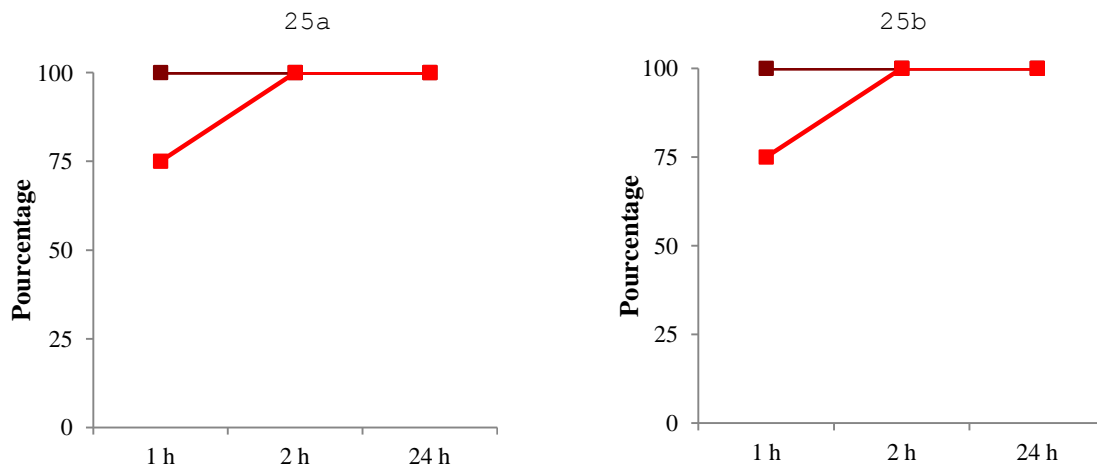
Tableau 41 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25

	Témoins (non contendus)	Témoins (contendus)
Temps en ZC (s)	11,7 ± 1,8	12,1 ± 1,3
Temps en ZI (s)	20,5 ± 2,8	22,6 ± 2,4
Temps en ZP (s)	267,5 ± 4,1	265,0 ± 2,8
Nombre total de cases traversées	113,8 ± 5,9	99,1 ± 5,1 *
Cases traversées en ZC (%)	4,5 ± 0,4	4,8 ± 0,4
Cases traversées en ZI (%)	11,9 ± 1,1	13,7 ± 1,0
Cases traversées en ZP (%)	83,3 ± 1,3	81,2 ± 1,2
Nombre total de redressements	32,4 ± 3,3	26,5 ± 2,4
Redressements en ZP (%)	73,2 ± 3,3	92,1 ± 1,3 **

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contendus)

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique



■ Témoins (non contenus) ■ Témoins (contendus)

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

Figures 25a, 25b et 25c : Pourcentage de mères des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contendus) ayant construit un nid à PN3 (25a), PN6 (25b) et PN9 (25c)

III.1.4.4. Tests à l'âge adulte

a. Labyrinthe en croix surélevé

L'ANOVA à 2 facteurs réalisée sur les données relevées dans ce test n'a montré aucun effet significatif de la contention sur le comportement lié à l'anxiété (**Tableau 42**). Seules des baisses significatives, ou tendant à l'être, du nombre total de branches visitées et du nombre de passages dans la ZC ont été observées chez les animaux nés de mères contendues par rapport à ceux nés de femelles libres de se mouvoir (**Tableau 42**).

De plus, un effet du sexe a été mis en évidence, montrant que les femelles ont effectué significativement plus d'entrées en BO, de passages dans la ZC et globalement un plus grand nombre d'entrées dans les deux types de branches du LCS comparé aux mâles (**Tableau 42**). Celles-ci ont également effectué plus de redressements et de *head-dipping* au cours du test, et montré un pourcentage de *head-dipping* effectués en BO plus élevé que les mâles (**Tableau 42**).

Enfin, aucune interaction entre ces deux facteurs n'a été mise en évidence par l'analyse des données (**Tableau 42**).

b. Open-field

Dans ce test, aucun effet de la contention appliquée au cours de la gestation n'a été mis en évidence, à l'exception d'une diminution du nombre de redressements effectués par les animaux nés de femelles contendues (**Tableau 43**). Toutefois, cette variation n'était pas significative ($p=0,067$) (**Tableau 43**).

Un effet du sexe a également été révélé par l'analyse des données, montrant que les femelles ont traversé plus de cases et effectué plus de redressements que les mâles au cours du test (**Tableau 43**).

Cependant, aucun effet de l'interaction entre les deux facteurs testés n'a été mis en évidence quelque soit le groupe (**Tableau 43**).

c. Boîte claire/obscur

Les résultats au test de la boîte claire/obscur n'ont montré aucun effet de la contention sur l'activité et l'anxiété des animaux testés à l'âge adulte (**Tableau 44**).

Par contre, un effet du sexe a été mis en évidence, les femelles ayant passé plus de temps dans le CC, réalisé plus d'alternances entre les deux compartiments et effectué plus de redressements dans le CC que les mâles (**Tableau 44**).

Tableau 42 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Entrées en BO	6,3 ± 0,7	9,0 ± 0,7	5,8 ± 0,7	8,3 ± 0,7	0,9	n.s.	13,8	<0,01	0,0	n.s.
Entrées en BF	7,7 ± 0,7	8,3 ± 0,7	6,7 ± 0,7	7,9 ± 0,7	1,2	n.s.	2,2	n.s.	0,2	n.s.
Nombre de passages en ZC	14,2 ± 1,0	17,8 ± 1,0	12,5 ± 1,0	15,5 ± 1,0	4,3	<0,05	12,7	<0,01	0,1	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	45,5 ± 3,0	51,3 ± 3,0	46,5 ± 3,0	50,6 ± 3,0	0,0	n.s.	2,8	p=0,1	0,1	n.s.
Nombre total d'entrées	14,0 ± 1,0	17,3 ± 1,0	12,4 ± 1,0	15,3 ± 1,0	3,9	p=0,055	11,2	<0,01	0,1	n.s.
Temps en BO (s)	110,3 ± 10,3	125,2 ± 10,3	100,6 ± 10,3	115,6 ± 10,3	0,9	n.s.	2,1	n.s.	0,0	n.s.
Temps en BF (s)	118,6 ± 10,0	111,5 ± 10,0	136,3 ± 10,0	119,8 ± 10,0	1,7	n.s.	1,4	n.s.	0,2	n.s.
Temps en ZC (s)	71,0 ± 5,9	63,4 ± 5,9	63,1 ± 5,9	64,5 ± 5,9	0,3	n.s.	0,3	n.s.	0,6	n.s.
Nombre total de redressements	20,0 ± 2,6	23,3 ± 2,6	15,4 ± 2,6	23,6 ± 2,6	0,7	n.s.	5,0	<0,05	0,9	n.s.
Redressements en BF (%)	81,1 ± 4,7	78,7 ± 4,7	80,5 ± 4,7	81,5 ± 4,7	0,1	n.s.	0,0	n.s.	0,1	n.s.
Nombre total de head dipping	9,8 ± 1,3	14,5 ± 1,3	9,3 ± 1,3	14,5 ± 1,3	0,0	n.s.	13,8	<0,01	0,0	n.s.
Head dipping en BO (%)	68,7 ± 4,2	80,9 ± 4,2	68,8 ± 4,2	84,2 ± 4,2	0,2	n.s.	10,8	<0,01	0,1	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

Tableau 43 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Temps en ZC (s)	13,3 ± 1,6	10,8 ± 1,6	12,3 ± 1,6	10,9 ± 1,6	0,1	n.s.	1,4	n.s.	0,1	n.s.
Temps en ZI (s)	35,5 ± 5,1	36,0 ± 5,1	28,6 ± 5,1	30,3 ± 5,1	1,6	n.s.	0,0	n.s.	0,0	n.s.
Temps en ZP (s)	251,2 ± 6,1	253,2 ± 6,1	259,1 ± 6,1	258,8 ± 6,1	1,2	n.s.	0,0	n.s.	0,0	n.s.
Nombre total de cases traversées	164,4 ± 9,9	183,1 ± 9,9	155,8 ± 9,9	173,0 ± 9,9	0,9	n.s.	3,3	p=0,076	0,0	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	6,2 ± 0,7	5,4 ± 0,7	4,9 ± 0,7	4,8 ± 0,7	2,0	n.s.	0,6	n.s.	0,3	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	17,9 ± 1,8	16,7 ± 1,8	13,3 ± 1,8	17,6 ± 1,8	1,1	n.s.	0,7	n.s.	2,2	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	75,9 ± 2,3	77,9 ± 2,3	81,8 ± 2,3	77,6 ± 2,3	1,6	n.s.	0,3	n.s.	1,9	n.s.
Nombre total de redressements	32,9 ± 3,7	39,0 ± 3,7	25,5 ± 3,7	32,5 ± 3,7	3,5	p=0,067	3,1	p=0,085	0,0	n.s.
Redressements en ZP (%)	91,1 ± 2,1	91,1 ± 2,1	93,0 ± 2,1	91,4 ± 2,1	0,3	n.s.	0,1	n.s.	0,2	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

Tableau 44 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Temps de 1 ^{ère} sortie dans le CC (s)	47,9 ± 10,2	53,1 ± 10,7	65,2 ± 10,2	40,5 ± 10,2	0,1	n.s.	0,9	n.s.	2,1	n.s.
Temps dans le CC (s)	88,0 ± 12,5	86,5 ± 12,5	55,7 ± 13,0	111,0 ± 13,6	0,1	n.s.	4,3	<0,05	4,8	<0,05
Nombre d'alternances	7,8 ± 1,1	9,6 ± 1,1	7,2 ± 1,2	12,0 ± 1,3	0,6	n.s.	7,7	<0,01	1,7	n.s.
Tentatives d'entrées dans le CC	3,3 ± 0,7	4,7 ± 0,7	4,5 ± 0,8	3,9 ± 0,8	0,1	n.s.	0,3	n.s.	1,6	n.s.
Redressements	10,8 ± 2,0	13,8 ± 2,0	5,5 ± 2,1	16,8 ± 2,2	0,3	n.s.	11,5	<0,01	3,7	p=0,06

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviation : CC, compartiment clair

Une interaction entre ces deux facteurs a également été observée sur le temps passé dans le CC et le nombre de redressements effectué dans ce compartiment, indiquant que les femelles nées de mères contendues ont été plus actives et moins anxieuses que les mâles du même groupe et les femelles nées de mères libres de se mouvoir (**Tableau 44**).

d. Labyrinthe en Y

Dans ce test, seule une tendance statistique à un effet de la contention sur le nombre de branches visitées au cours de la 1^{ère} minute de test a été observée, suggérant que les animaux nés de mères contendues au cours de la gestation ont été moins actifs que ceux nés de mères libres de se mouvoir lors de la 1^{ère} minute de test (**Tableau 45**).

Par ailleurs, des variations liées au sexe ont également été observées. Comparées aux mâles, les femelles ont significativement visité plus de branches au cours de la 1^{ère} minute, ainsi que durant les 10 minutes de test. Elles ont également effectué plus de redressements que les mâles (**Tableau 45**). Par ailleurs, un pourcentage plus faible de triplets justes effectué au cours du test a été observé chez les femelles comparé aux mâles (**Tableau 45**).

Enfin, aucune interaction entre les effets de la contention et du sexe n'a été révélée par le traitement statistique (**Tableau 45**).

e. Labyrinthe radial à 8 branches

L'ANOVA à 3 facteurs réalisée sur les données relevées dans ce test a montré des effets des facteurs principaux (facteurs « Contention » et « Jour de test »), ainsi que des interactions entre les différents facteurs testés sur le comportement des animaux.

Les rats nés de femelles placées en contention au cours de la gestation ont ainsi significativement mis plus de temps à visiter les 8 branches du test, ont visité moins de branches par minute et ont eu tendance à visiter plus de branches avant de réussir le test comparé aux animaux nés de mères libres de se mouvoir (**Tableau 46**).

Le sexe n'a quant à lui eu aucune influence sur le comportement des animaux dans ce test (**Tableau 46**). Par ailleurs, un effet de la répétition des séances de test (facteur « Jour de test ») a été observé, montrant une amélioration significative des performances de l'ensemble des animaux au niveau des quatre variables observées au cours des 10 séances de test (**Tableau 46**).

Par ailleurs, une interaction entre les effets de la contention et du sexe a été observée sur le temps d'exécution du test, indiquant que les femelles nées de mères contendues ont été plus rapides que les femelles nées de mères laissées libres de se mouvoir et que les mâles nés de mères contendues à

Tableau 45 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Alternance spontanée (%)	65,3 ± 2,5	60,3 ± 2,6	65,4 ± 2,5	60,9 ± 2,5	0,0	n.s.	3,7	p=0,061	0,0	n.s.
Nombre total de branches visitées	31,4 ± 2,3	42,4 ± 2,4	29,3 ± 2,3	38,8 ± 2,3	1,4	n.s.	19,0	<0,01	0,1	n.s.
Nombre de branches visitées (1 ^{ère})	4,3 ± 0,4	5,9 ± 0,4	3,8 ± 0,4	4,9 ± 0,4	3,0	p=0,091	11,3	<0,01	0,5	n.s.
Redressements	74,7 ± 4,6	88,1 ± 4,8	74,3 ± 4,6	82,8 ± 4,6	0,4	n.s.	5,7	<0,05	0,3	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Tableau 46 : Effets du stress de contention de la rate gestante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches

	Jour 1		Jour 4		Jour 7		Jour 10	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Temps total (s)								
Témoins (non contenus)	74,5 ± 8,0	85,0 ± 8,0	41,1 ± 8,1	54,3 ± 8,1	33,9 ± 7,1	48,0 ± 7,1	29,2 ± 4,3	30,3 ± 4,3
Témoins (contendus)	87,2 ± 8,0	77,4 ± 8,4	64,1 ± 8,1	51,8 ± 8,5	52,8 ± 7,1	48,5 ± 7,4	38,2 ± 4,3	34,8 ± 4,5
Nombre total de branches visitées								
Témoins (non contenus)	11,4 ± 0,7	11,8 ± 0,7	9,4 ± 0,8	10,6 ± 0,8	8,4 ± 0,8	10,0 ± 0,8	8,9 ± 0,5	8,8 ± 0,5
Témoins (contendus)	12,6 ± 0,7	11,6 ± 0,7	11,9 ± 0,8	10,5 ± 0,8	10,1 ± 0,8	10,8 ± 0,8	9,6 ± 0,5	8,8 ± 0,5
Nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur								
Témoins (non contenus)	4,8 ± 0,5	5,8 ± 0,5	6,5 ± 0,5	5,6 ± 0,5	7,3 ± 0,4	6,7 ± 0,4	6,7 ± 0,4	7,5 ± 0,4
Témoins (contendus)	5,0 ± 0,5	4,6 ± 0,5	6,2 ± 0,5	6,4 ± 0,5	6,6 ± 0,4	7,0 ± 0,4	6,3 ± 0,4	7,5 ± 0,4
Nombre de branches visitées / min								
Témoins (non contenus)	9,8 ± 0,9	9,3 ± 0,9	14,9 ± 1,0	13,9 ± 1,0	16,4 ± 1,4	13,9 ± 1,4	19,5 ± 1,5	19,5 ± 1,5
Témoins (contendus)	9,2 ± 8,6	9,8 ± 0,9	11,8 ± 1,0	13,1 ± 1,0	12,8 ± 1,4	13,9 ± 1,4	17,3 ± 1,5	16,6 ± 1,5

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M.

	Contention		Sexe		Jour de test		Contention × Sexe		Contention × Jour		Sexe × Jour		Contention × Sexe × Jour	
	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p
Temps total (s)	8,6	<0,01	0,0	n.s.	20,4	<0,01	4,0	p=0,051	0,7	n.s.	1,0	n.s.	0,9	n.s.
Nombre total de branches visitées	3,9	p=0,054	0,2	n.s.	6,9	<0,01	1,5	n.s.	0,3	n.s.	0,8	n.s.	0,4	n.s.
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur	0,3	n.s.	0,1	n.s.	13,8	<0,01	0,3	n.s.	0,3	n.s.	2,3	<0,05	1,0	n.s.
Nombre de branches visitées / min	9,7	<0,01	0,1	n.s.	28,0	<0,01	0,9	n.s.	3,1	<0,01	1,2	n.s.	1,0	n.s.

Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

réaliser cette épreuve (**Tableau 46**). Une autre interaction entre le groupe et le jour de test a également été mis en évidence sur le nombre de branches visitées par minute, montrant que les animaux nés de femelles exposées à la contention ont visité moins de branches par minute que les rats nés de mères non contendues au cours des 10 jours de test (**Tableau 46**). Une interaction entre le sexe et le jour de test a été aussi observée sur le nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur, révélant que les femelles ont amélioré leurs performances plus rapidement que les mâles au cours des 10 jours de test (**Tableau 46**).

Enfin, aucune interaction entre les trois facteurs testés n'a été mise en évidence (**Tableau 46**).

III.1.5. Conclusion

III.1.5.1. Effet de l'exposition au fluorène

a. Sur le développement neuromoteur et sensoriel

L'exposition prénatale des animaux au fluorène a induit chez les jeunes des modifications du développement de certaines aptitudes sensori-motrices mais qui semblent transitoires et réversibles.

Ainsi, les jeunes exposés *in utero* à 1,5 ppb de fluorène ont montré une diminution de leurs performances au test de retournement à PN4 et PN5, ceux-ci ayant été moins nombreux à se retourner comparés aux animaux des deux autres groupes à PN5 (**Figure 15a**). Cette variation qui peut être révélatrice d'un retard de maturation ne semble pas persister puisqu'à PN10 ces animaux ont été plus rapides que les jeunes des deux autres groupes à réaliser le test de la réaction anti-gravitaire, des pourcentages de réussite à ce test équivalents ayant été observés entre les groupes (**Figures 18a et 18b**). Par ailleurs, les animaux exposés à la plus faible concentration de fluorène (1,5 ppb) ont ouvert les yeux plus tôt que ceux des deux autres groupes, indiquant chez ces animaux une maturation plus précoce des fonctions visuelles (**Figure 21**).

A PN20, un nombre plus faible d'animaux appartenant aux deux groupes exposés au polluant a réussi le test de la coordination locomotrice comparé aux témoins, les performances devenant identiques entre les groupes le jour suivant (**Tableau 33**). De tels résultats suggèrent un défaut de maturation de la coordination locomotrice qui est transitoire comme il a été observé avec les tests de retournement et de la réaction anti-gravitaire.

L'analyse de l'évolution des performances a également montré que les jeunes des deux groupes exposés au fluorène ont globalement amélioré leurs résultats au cours des différentes épreuves.

Par ailleurs, les résultats obtenus à l'issue de l'observation des animaux dans l'OF à 25 jours ont révélé que les jeunes des deux groupes exposés au fluorène ont été plus actifs que les témoins (**Tableau 34**).

Les résultats obtenus ont ainsi montré un plus grand nombre de modifications chez les animaux exposés *in utero* à 1,5 ppb de fluorène, indiquant que l'exposition à la plus faible concentration est susceptible d'induire davantage d'effets délétères qu'à la plus forte concentration testée dans cette étude. Les différents troubles observés ne persistant néanmoins pas sur la période de test, ceux-ci ne traduisent aucune atteinte majeure du développement des fonctions motrices et sensorielles chez les animaux exposés en période prénatale au fluorène. En revanche, après le sevrage, une augmentation du niveau d'activité a été observée chez les animaux des deux groupes exposés au polluant.

b. Sur le comportement observé à l'âge adulte

Des modifications concernant les trois composantes comportementales étudiées ont été mises en évidence chez les animaux adultes exposés *in utero* au fluorène.

Une augmentation du niveau d'activité a ainsi été observée chez les animaux exposés à 1,5 (LCS, OF, labyrinthe radial à 8 branches) et à 150 ppb (LCS, labyrinthe radial à 8 branches) de fluorène en période prénatale. Cette variation ayant déjà été mise en évidence à PN25, ce résultat montre un effet persistant des troubles de l'activité locomotrice précoce à l'âge adulte. De plus, une interaction entre le groupe d'exposition et le sexe a été observée dans le labyrinthe radial à 8 branches, indiquant que les femelles ont été plus actives que les mâles au cours des 1^{ers} jours de test (labyrinthe radial à 8 branches, BCO).

Par ailleurs, une diminution significative de l'anxiété a été mise en évidence chez les animaux adultes exposés *in utero* à 1,5 ppb (LCS, OF) et à 150 ppb (LCS) de fluorène. Un effet de l'interaction des facteurs liés à l'exposition et au sexe des animaux a également été mis en évidence, montrant que les femelles exposées à 150 ppb de fluorène ont été moins anxieuses que les mâles du même groupe (OF, BCO) et que les mâles exposés à 1,5 ppb de fluorène ont été moins anxieux et plus actifs que les mâles témoins (BCO).

De plus, les mâles exposés à 1,5 ppb de fluorène ont eu tendance à montrer de meilleures capacités d'apprentissage à court terme par rapport aux animaux témoins (LY) et les femelles ont montré un déficit de mémoire immédiate au cours des 1^{ers} jours de test dans le labyrinthe radial à 8 branches comparé aux mâles. Les résultats ont également montré une amélioration des performances des animaux dans le labyrinthe radial à 8 branches au cours des 10 jours de test, montrant que l'exposition prénatale au fluorène n'induit aucune atteinte des capacités de mémorisation à long terme.

De même que cela a sensiblement été observé au cours du développement précoce, un effet plus marqué de l'exposition à 1,5 ppb de fluorène a été mis en évidence sur le comportement des animaux à

l'âge adulte. De plus, les mêmes registres comportementaux ont été perturbés par l'exposition prénatale à 1,5 et 150 ppb de fluorène.

Une interaction entre les facteurs liés à l'exposition au polluant et au sexe a également été mise en évidence, montrant que les mâles exposés à 1,5 ppb de fluorène ont été moins anxieux et plus actifs que les mâles des deux autres groupes et que les femelles exposées à 150 ppb de fluorène ont été moins anxieuses et plus actives que les mâles exposés à la même concentration.

III.1.5.2. Effet du stress prénatal de contention

a. Sur le développement neuromoteur et sensoriel

Les résultats des animaux des deux groupes témoins aux différents tests réalisés de la naissance au 25^{ème} jour de vie postnatale ont permis de mettre en évidence un effet du stress prénatal de contention sur le développement sensori-moteur des jeunes rats. Les animaux nés de femelles contendues au cours de la gestation ont ainsi globalement été plus lents et/ou moins performants dans la plupart des tests effectués comparé aux animaux témoins libres de se mouvoir (**Tableau 40**). De plus, un retard de maturation des systèmes auditif et visuel a été observé chez ces animaux comparé aux jeunes témoins (**Figures 23 et 24**).

Pour autant, même si elle a été plus lente, la maturation neuro-sensorielle du jeune a été complète, mais avec comme question les conséquences éventuelles que ce retard de maturation peut engendrer à plus long terme.

b. Sur le comportement observé à 25 jours et à l'âge adulte

L'exposition au stress prénatal de contention a induit dès 25 jours d'âge postnatal une baisse de l'activité dans l'OF qui a été retrouvée à l'âge adulte dans les différents tests effectués (LCS, OF, LY, Labyrinthe radial à 8 branches).

Il est également à noter que les femelles ont globalement montré un niveau d'activité plus élevé que les mâles dans les différents tests réalisés.

Par ailleurs, des effets parcellaires ont été observés sur la mémoire et l'anxiété, indiquant que le stress prénatal de contention a conduit avant tout à un effet sur l'activité des animaux.

III.2. Effets de l'inhalation de fluorène par la rate allaitante sur le développement neurocomportemental du jeune

III.2.1. Métrologie atmosphérique

De même que dans l'étude précédente, les concentrations atmosphériques de fluorène ont respecté durant toute la période d'exposition les concentrations de 1,5 et 150 ppb selon les normes fixées par l'OCDE (OCDE 2009) (**Figures 26a et 26b**). Les relevés de température et d'humidité étaient également en accord avec les normes établies par la directive (**Figures 27a et 27b**). Les résultats de ce contrôle confirment donc l'exposition, dans les conditions souhaitées, des animaux durant les 14 jours aux niveaux de contamination préétablis.

III.2.2. Reproduction

A l'issue de la période de gestation, 26 femelles ont mis bas et donné naissance à 251 jeunes. Par rapport au nombre de femelles initialement accouplées, 92,3% des accouplements effectués se sont donc avérés positifs. A la parturition, celles-ci ont été réparties dans les différents groupes d'exposition, de manière à constituer 4 groupes de 6 femelles. Le nombre de ratons dans les portées a été standardisé à 10 à PN1. Un sex ratio équivalent entre les groupes a également été observé (**Tableau 47**).

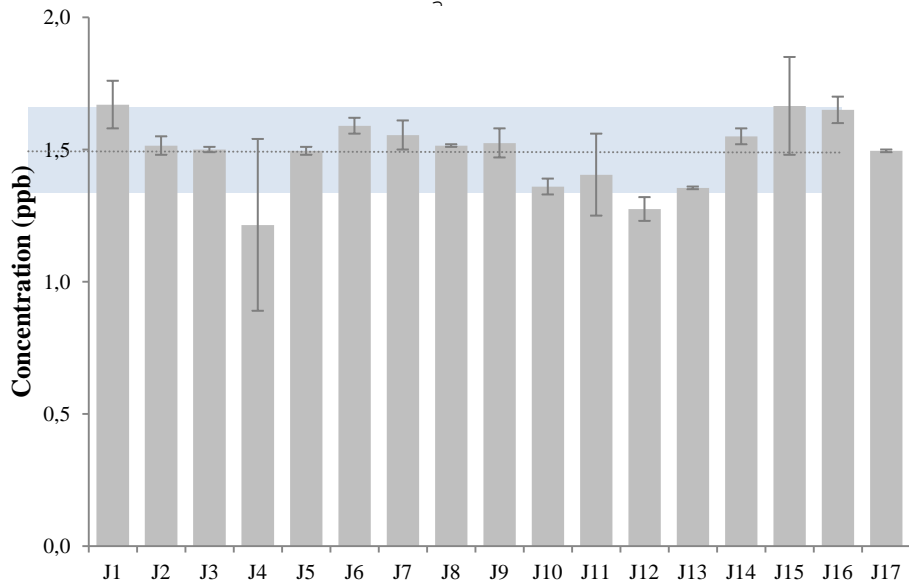
III.2.3. Effets de l'exposition au fluorène

III.2.3.1. Tests neurodéveloppementaux

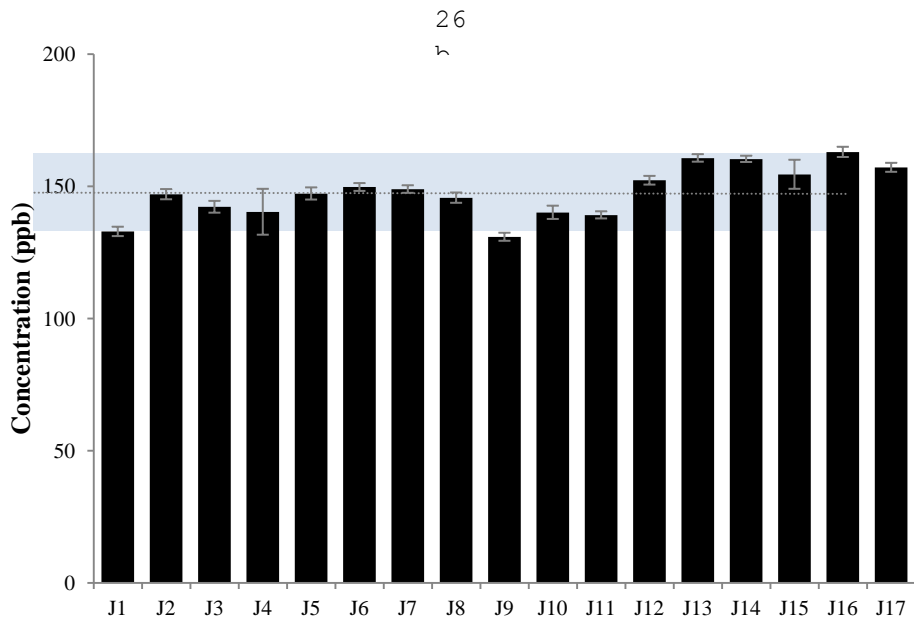
a. Test de retournement

Les résultats obtenus n'ont révélé aucune différence entre les groupes concernant le pourcentage de réussite à PN3 et PN4 (**Figure 28a**). Par contre à PN5, un pourcentage de réussite plus faible a été observé chez les animaux exposés à 150 ppb de fluorène comparé aux témoins et aux jeunes exposés à 1,5 ppb de fluorène (**Figure 28a**). Par ailleurs, le temps de retournement observé à PN4 chez les jeunes exposés à 150 ppb de fluorène a été significativement plus long que celui mesuré chez les témoins et les animaux exposés à 1,5 ppb (**Figure 28b**).

Le test de Friedman a par ailleurs permis de mettre en évidence une amélioration significative des performances des animaux du groupe témoin et de ceux exposés à 1,5 ppb de fluorène au cours des



moyenne \pm E.S.M.



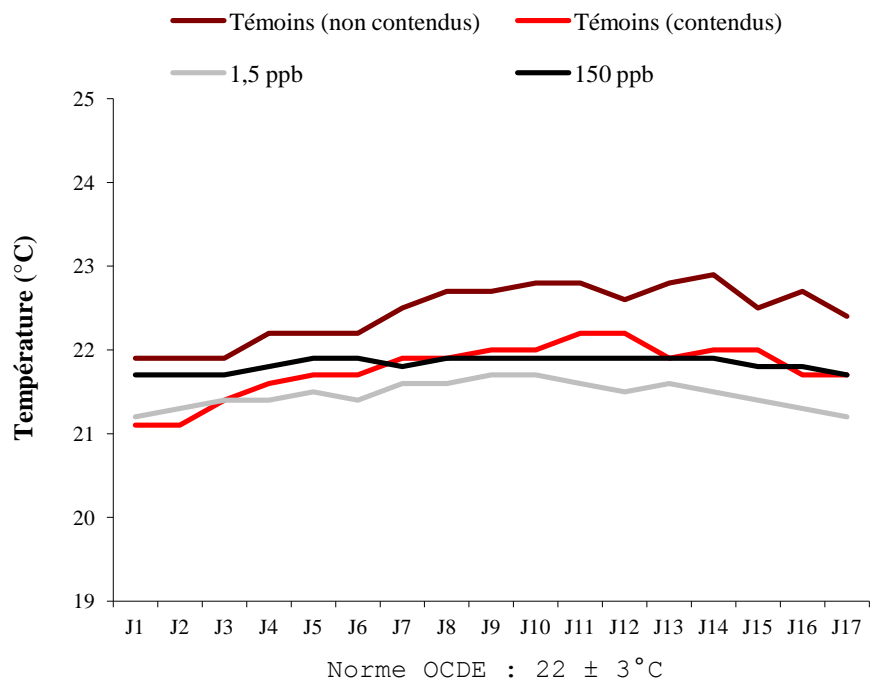
moyenne \pm E.S.M.

Figures 26a et 26b : Concentrations de fluorène générées dans les cellules contaminées quotidiennement pendant 17 jours à 1,5 ppb (26a) et à 150 ppb (26b)

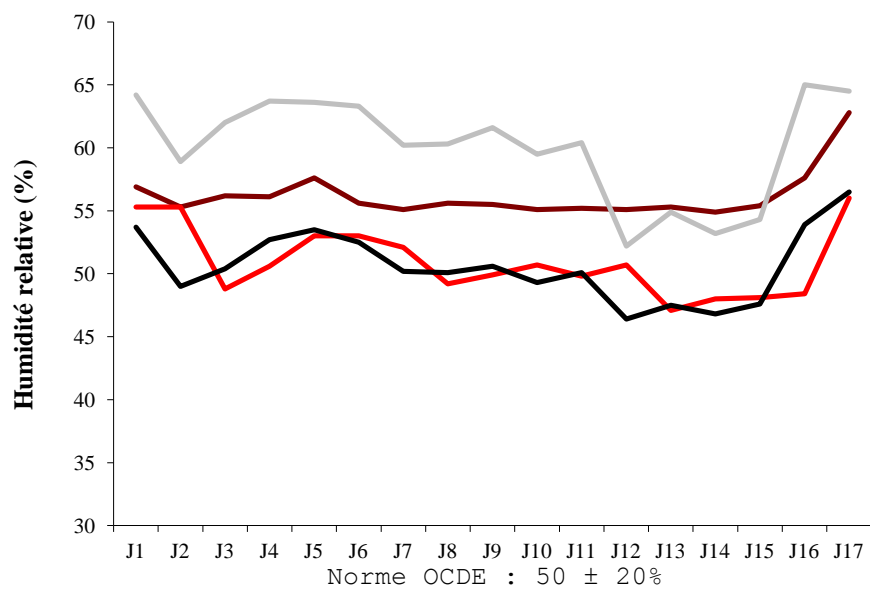
..... Moyenne des 14 jours d'exposition

■ Concentrations autorisées par l'OCDE (moyenne \pm 10%)

27a



27b

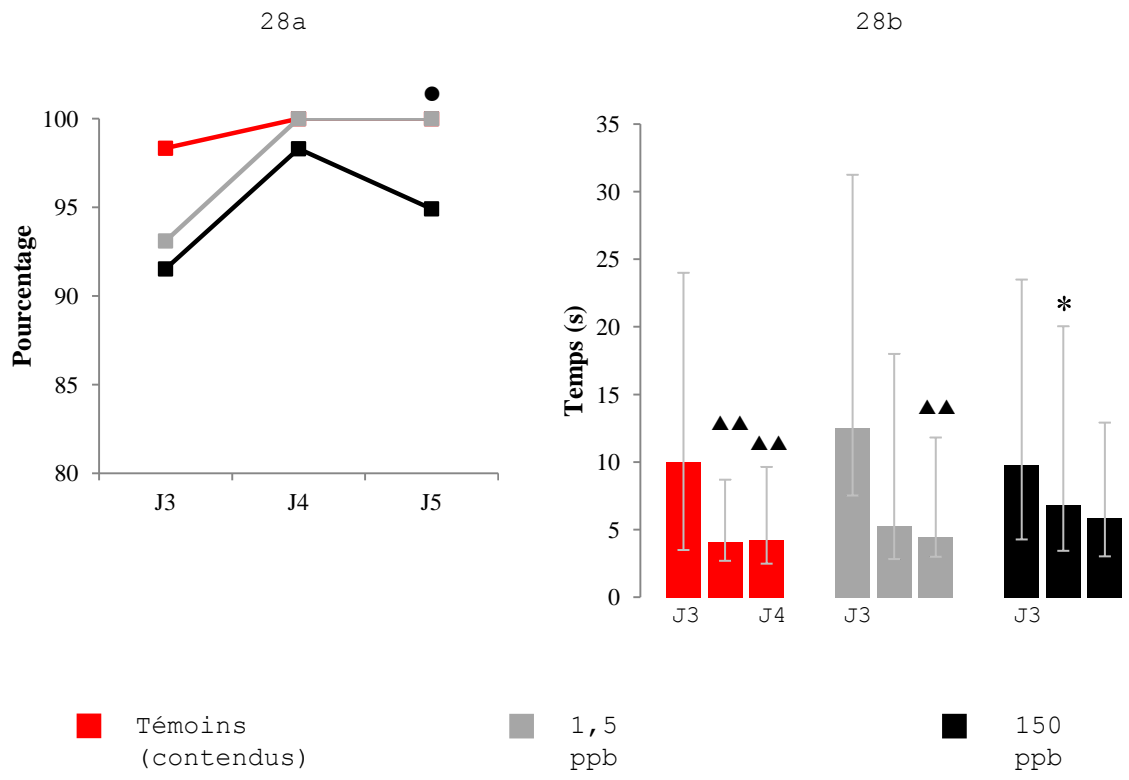


Figures 27a et 27b : Moyennes de la température (27a) et de l'humidité relative (27b) relevées dans les cellules d'exposition des animaux des quatre groupes

Tableau 47 : Données relatives à la reproduction

Nombre de femelles accouplées	26
Nombre total de ratons	251
Accouplements réussis (%)	92,3
Durée de la gestation	21,8

	Témoins (non contenus)	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb
Nombre de femelles	6	6	6	6
Nombre de ratons	60	60	60	60
Sex ratio	0,58	0,50	0,48	0,47



Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Mann-Whitney et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

- : $p < 0,05$ effets statistiquement significatifs
- * : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins
- ▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

Figures 28a et 28b : Pourcentage de réussite au test de retournement (28a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb pour se retourner (médianes et quartiles) (28b)

trois jours de test (Témoins (contendus) : $F=13,5$; $p=0,001$, 1,5 ppb : $F=8,4$; $p=0,015$), mais pas de ceux contaminés à 150 ppb ($F=1,7$; $p=0,43$) (**Figure 28b**).

b. Réflexe d'agrippement

Le traitement des données n'a montré aucune différence entre les trois groupes concernant le pourcentage de réussite au test d'agrippement au cours des trois jours de test (**Figure 29a**). Par contre, une variation significative du temps d'agrippement a été observée à PN4, montrant que les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène sont restés agrippés plus longtemps que les rats témoins et ceux exposés à 150 ppb de fluorène (**Figure 29b**). A PN5 et PN6, plus aucune différence concernant l'angle atteint avant la chute n'a été observée entre les trois groupes (**Figure 29b**).

Il est également à noter que les animaux témoins et ceux exposés à 150 ppb de fluorène ont montré une amélioration significative de leur performance au cours des trois jours de test (Témoins (contendus) : $F=10,6$; $p=0,005$, 150 ppb : $F=18,5$; $p=0,000$) (**Figure 29b**).

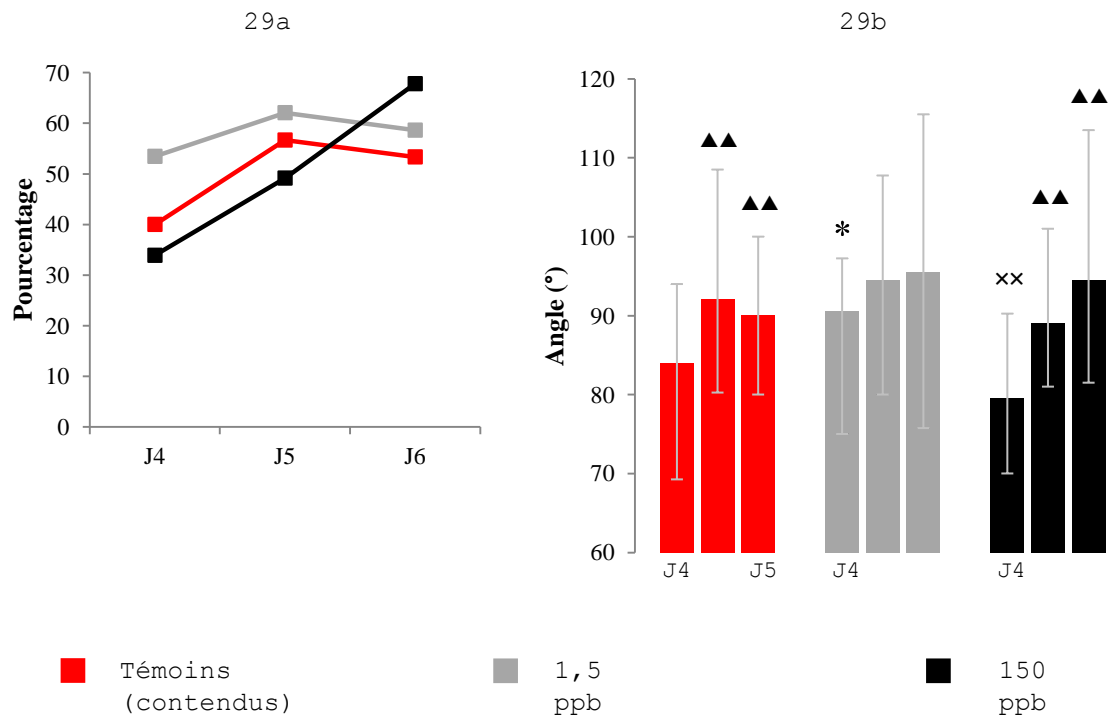
c. Cliff avoidance

Concernant les pourcentages de réussite au test, aucune différence n'a été observée entre les animaux des trois groupes quelque soit le jour de test (**Figure 30a**). En revanche, les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène ont été plus rapides que les témoins et les jeunes exposés à 150 ppb de fluorène pour reculer sur la plate-forme (**Figure 30b**). Lors des deux jours suivants, aucune différence entre les groupes n'a été détectée (**Figure 30b**).

Enfin, l'analyse des performances des animaux au cours des trois jours de test a montré une amélioration significative du temps de recul dans les trois groupes (Témoins (contendus) : $F=37,2$; $p=0,000$, 1,5 ppb : $F=23,7$; $p=0,000$, 150 ppb : $F=32,7$; $p=0,000$) (**Figure 30b**).

d. Réaction anti-gravitaire

Les résultats du test de la réaction anti-gravitaire n'ont montré aucune différence entre les groupes concernant le pourcentage de réussite quelque soit le jour de test (**Figure 31a**). En revanche, des variations significatives concernant le temps mis par les animaux pour effectuer la rotation de 180° ont été observées au cours de ces trois jours (**Figure 31b**). Ainsi, à PN8, les animaux des deux groupes exposés au fluorène ont mis plus de temps que les témoins à réaliser cette épreuve (**Figure 31b**). A PN9, seuls les animaux exposés à 150 ppb de fluorène ont été plus lents que les témoins et que les jeunes



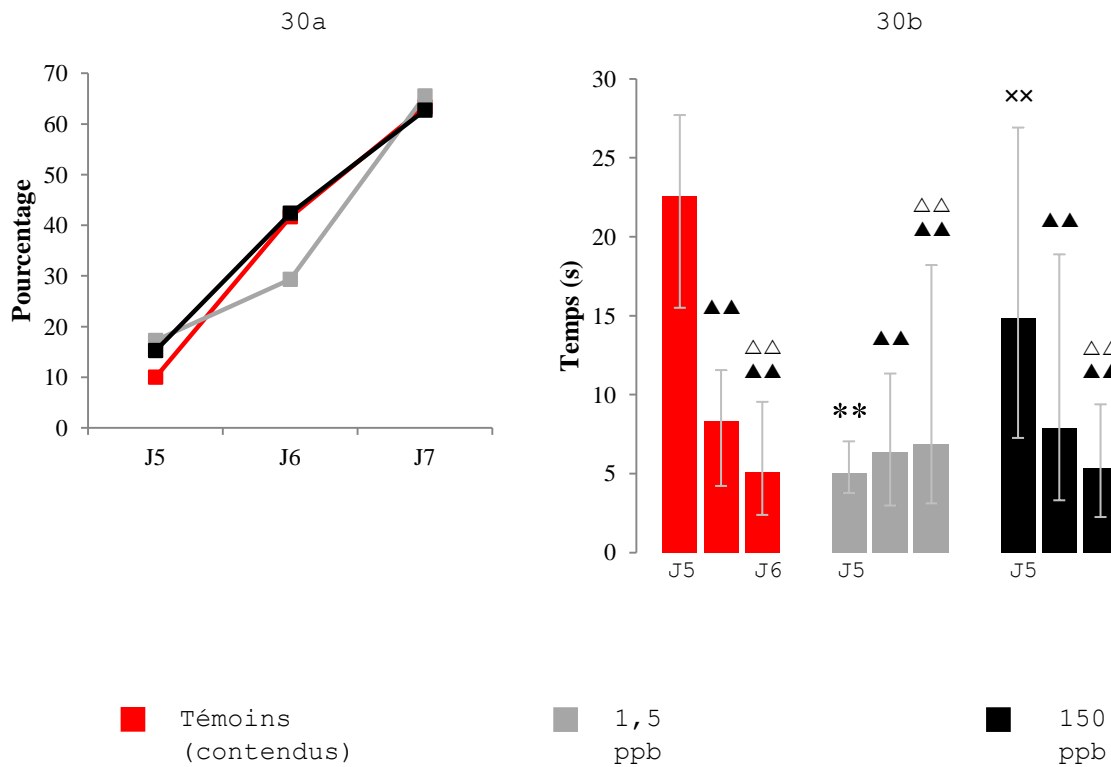
Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Mann-Whitney et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

xx : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux animaux exposés à 1,5 ppb

▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

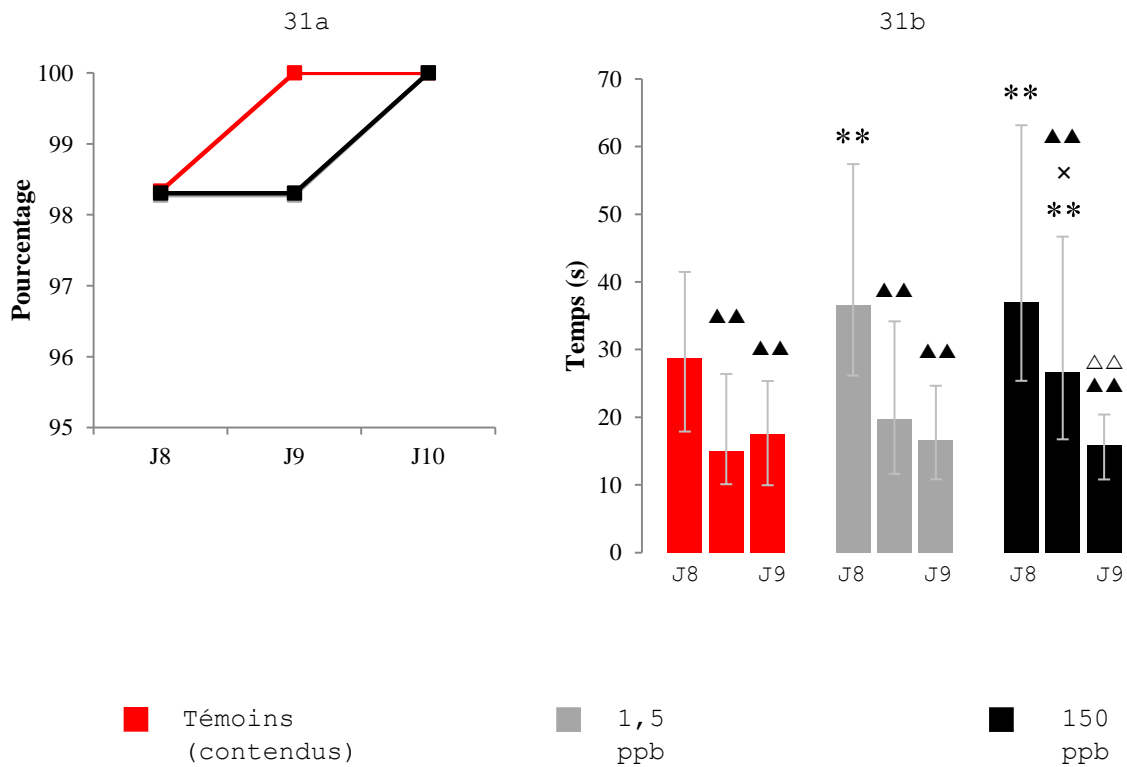
Figures 29a et 29b : Pourcentage de réussite au test d'agrippement (29a) et angle atteint par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles) (29b)



Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Mann-Whitney et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

- * : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins
- xx : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux animaux exposés à 1,5 ppb
- ▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test
- △△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

Figures 30a et 30b : Pourcentage de réussite au test du *cliff avoidance* (30a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb pour reculer sur la plate-forme (médianes et quartiles) (30b)



Le Khi-deux de Pearson, le test de Kruskal-Wallis et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Mann-Whitney et le test de Wilcoxon ont été utilisés pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

× : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux animaux exposés à 1,5 ppb

▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

△△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

Figures 31a et 31b : Pourcentage de réussite au test de la réaction anti-gravitaire (31a) et temps mis par les animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb pour effectuer une rotation de 180° (médianes et quartiles) (31b)

exposés à 1,5 ppb de fluorène pour effectuer la rotation (**Figure 31b**). Enfin à PN10, plus aucune différence entre les trois groupes n'a été observée (**Figure 31b**).

Par ailleurs, les animaux des trois groupes ont significativement amélioré leurs performances au cours de la période de test (Témoins (contendus) : $F=17,2$; $p=0,000$, 1,5 ppb : $F=30,1$; $p=0,000$, 150 ppb : $F=32,7$; $p=0,000$) (**Figure 31b**).

e. Test de suspension

Les résultats obtenus ont montré que les animaux exposés à 1,5 et 150 ppb de fluorène sont restés suspendus au fil métallique moins longtemps que les témoins (**Figure 32**).

f. Test du sursaut au bruit

Au cours des cinq jours de test, seule une différence a été observée entre les groupes à PN13, les animaux exposés au fluorène étant moins sensibles à la stimulation sonore comparés aux témoins (**Figure 32**). Aucune différence n'a été ensuite observée entre les animaux (**Figure 33**).

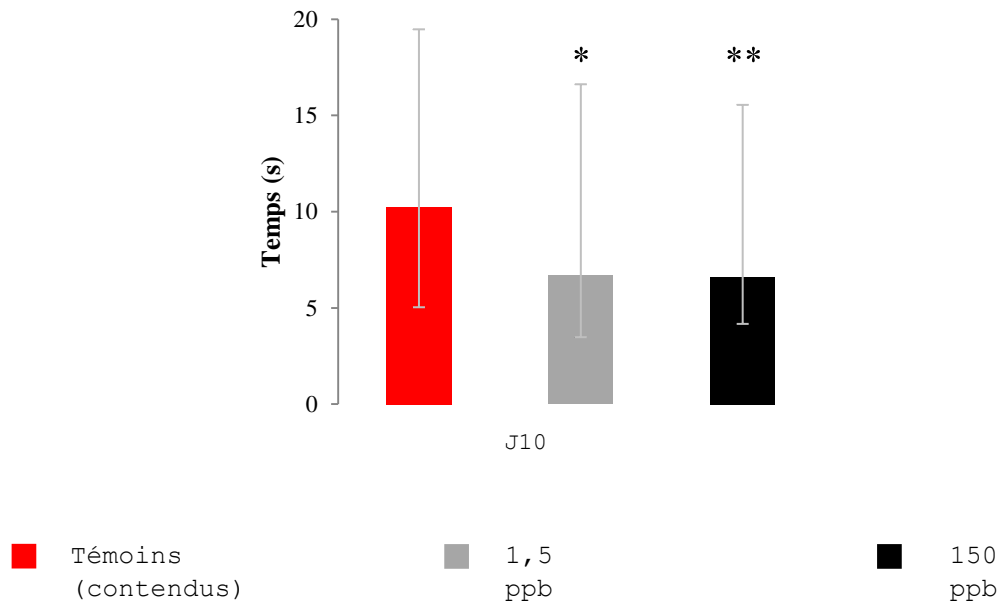
g. Ouverture des yeux

L'analyse des données a permis de détecter une différence à PN16, indiquant à ce jour un pourcentage plus faible d'animaux exposés à 150 ppb ayant les yeux ouverts comparé à aux deux autres groupes (**Figure 34**).

h. Test de coordination locomotrice

Les résultats ont montré une évolution identique des performances mesurées dans ce test quelque soit le groupe expérimental reflété par un accroissement du pourcentage de réussite et une baisse simultanée du temps mis pour réaliser le test entre PN19 et PN21 (**Tableau 48**). Lorsque sont étudiées les différentes phases du test, il est à noter une augmentation significative du temps mis pour se rétablir sur la plate-forme dans les deux groupes de rats exposés au fluorène par rapport aux témoins (**Tableau 48**).

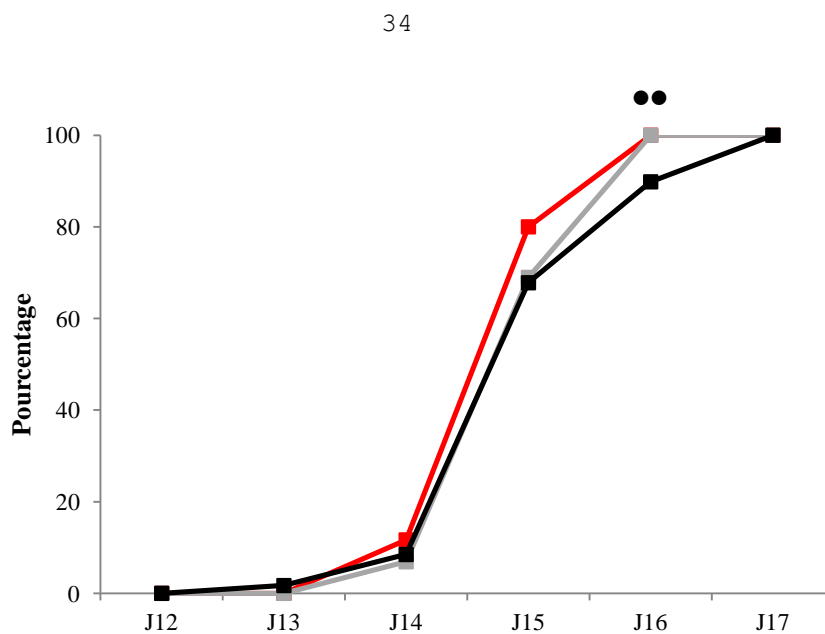
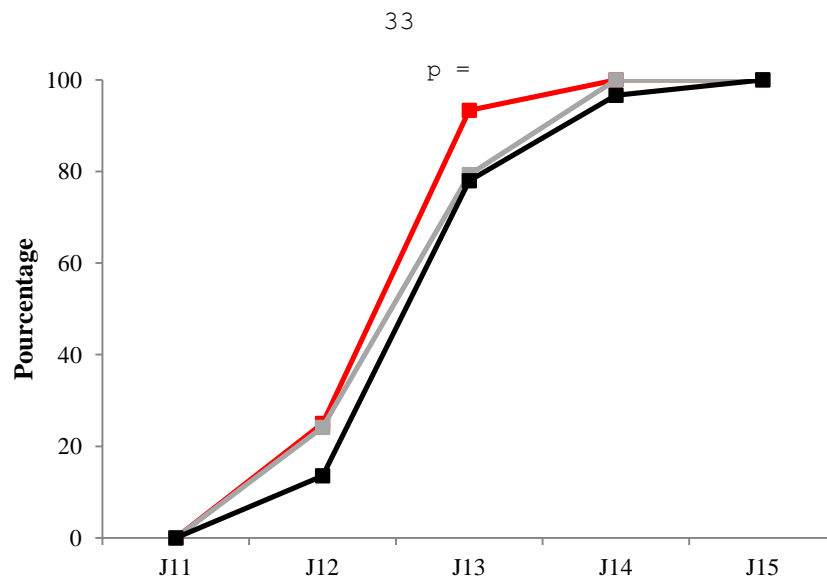
Par contre, les autres phases du test n'ont pas été affectées par l'exposition au polluant quelque soit le jour de test considéré (**Tableau 48**).



Le test de Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les animaux des trois groupes. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparaisons multiples.

** : $p < 0,01$; * : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins

Figure 32 : Temps de suspension des animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb avant la chute (médianes et quartiles)



■ Témoins (contendus)
 ■ 1,5 ppb
 ■ 150 ppb

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des trois groupes.

•• : $p < 0,01$ effets statistiquement significatifs

Figures 33 et 34 : Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN15 (33) et ayant les yeux ouverts entre PN12 et PN17 (34)

Tableau 48 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur le comportement du jeune rat dans le test de coordination locomotrice

	Témoins (contendus)			1,5 ppb			150 ppb		
	J19	J20	J21	J19	J20	J21	J19	J20	J21
Temps de nage (s)	43,0 (33,0 - 54,0)	11,5 ▲▲ (6,0 - 19,0)	5,0 ▲▲△△ (3,0 - 10,0)	42,0 (30,0 - 70,0)	15,5 *▲▲ (8,3 - 27,5)	7,0 ▲▲△△ (3,3 - 11,0)	48,0 (32,0 - 60,0)	16,0 *▲▲ (11,0 - 20,0)	6,0 ▲▲△△ (4,0 - 12,0)
Temps de grimpe (s)	16,0 (11,0 - 24,0)	9,0 ▲▲ (7,0 - 14,0)	7,0 ▲▲△△ (6,0 - 11,0)	18,0 (11,0 - 30,0)	9,5 ▲▲ (6,3 - 18,0)	7,0 ▲▲△△ (5,3 - 11,0)	14,0 (11,0 - 24,0)	10,0 ▲▲ (6,0 - 13,0)	7,5 ▲▲△ (5,0 - 12,0)
Temps de rétablissement sur la plate-forme (s)	9,0 (7,0 - 13,0)	5,5 ▲▲ (4,0 - 9,0)	5,0 ▲▲ (3,0 - 8,0)	12,0 ** (10,0 - 17,0)	7,0 ▲▲ (4,3 - 10,0)	3,0 **▲▲△△ (2,3 - 5,8)	15,0 ^a (7,0 - 23,0)	5,0 ▲▲ (4,0 - 7,0)	4,0 *▲▲ (3,0 - 5,0)
Temps total (s)	73,0 (51,0 - 94,0)	26,0 ▲▲ (20,0 - 37,3)	19,0 ▲▲△△ (14,0 - 27,0)	79,0 (58,0 - 148,0)	36,0 *▲▲ (26,0 - 51,5)	19,0 ▲▲△△ (13,3 - 25,5)	73,0 (60,0 - 125,0)	30,0 ▲▲ (24,0 - 41,0)	20,0 ▲▲△△ (14,3 - 26,0)
Réussite (%)	85,0	93,3	100	87,9	96,6	96,6	81,4	94,9	96,6

Les résultats sont présentés sous forme de médianes, les rangs étant indiqués entre parenthèses, et de pourcentages moyens. Le Khi-deux de Pearson, le test de Mann-Whitney et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des deux groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : $p=0,059$

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (contendus)

▲ : $p < 0,05$; ▲▲ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

△ : $p < 0,05$; △△ : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

i. Open-field

Parmi toutes les variables mesurées dans ce test, seule une augmentation significative du pourcentage de redressements effectués en ZP a été observée chez les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène comparé aux témoins et aux animaux exposés à 150 ppb (**Tableau 49**). Aucune différence entre les trois groupes n'a été révélée par ailleurs (**Tableau 49**).

III.2.3.2. Comportement maternel

a. Construction du nid

L'analyse des données caractérisant la qualité du nid construit n'a montré aucune différence entre les femelles des trois groupes quelque soit le jour de test (**Figures 35a, 35b et 35c**).

b. Ramassage des jeunes

L'ANOVA à 2 facteurs a permis de détecter des différences significatives dans le comportement des mères des trois groupes étudiés. En effet, les femelles exposées au fluorène ont regroupé plus rapidement que les mères témoins l'ensemble des jeunes au sein d'un nid (**Tableau 50**). Une tendance à une augmentation de la latence du 1^{er} ramassage a par ailleurs été observée pour l'ensemble des femelles au cours des trois jours de test (**Tableau 50**). En revanche, aucun effet de l'exposition au fluorène ou du jour d'observation n'a été montré sur le temps total consacré aux jeunes durant le test (**Tableau 50**). De même, aucun effet de l'interaction de ces deux facteurs n'a été observé (**Tableau 50**). Concernant la qualité de construction du nid, une différence significative entre les groupes a été observée à PN4, montrant que les mères exposées au fluorène ont construit un nid de meilleure qualité que les femelles témoins (**Figure 36**). A PN7 et PN10, aucune différence n'a été observée entre les groupes (**Figure 36**).

III.2.3.3. Poids corporel

Une variation significative concernant le pourcentage de variation du poids corporel, calculé chaque jour de PN4 à PN21 par rapport à PN3, a été observée entre les trois groupes. De manière globale, les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène ont pris moins de poids et ceux exposés à 150 ppb de fluorène ont pris plus de poids que les animaux témoins au cours des trois premières semaines de vie postnatale (**Figure 37**).

Tableau 49 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25

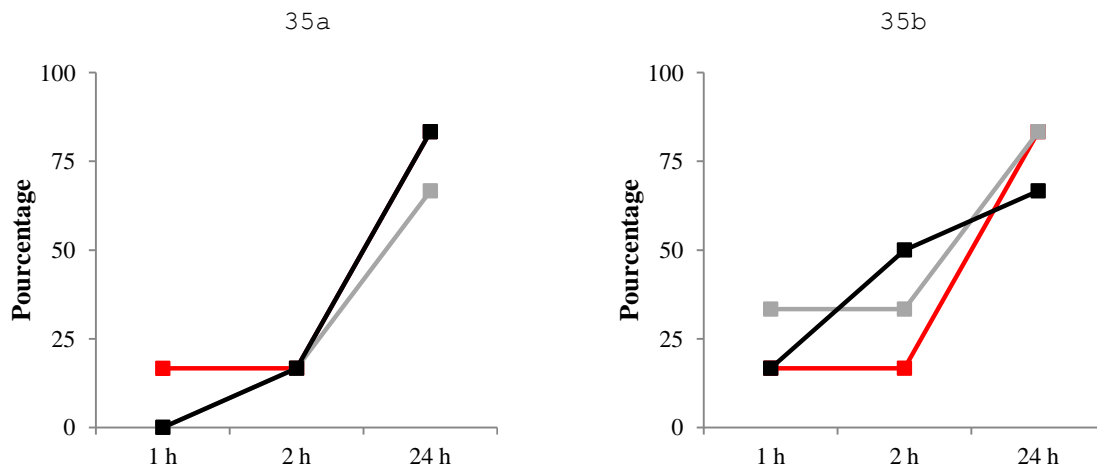
	Témoins (contendus)	1,5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F _[3, 27]	p
Temps en ZC (s)	9,2 ± 1,0	9,0 ± 1,1	11,1 ± 1,2	1,0	n.s.
Temps en ZI (s)	33,3 ± 2,5	27,2 ± 2,0	33,9 ± 3,0	1,6	n.s.
Temps en ZP (s)	257,6 ± 2,9	263,8 ± 2,5	255,0 ± 3,6	1,6	n.s.
Nombre total de cases traversées	124,3 ± 4,1	122,7 ± 3,7	129,4 ± 5,0	0,6	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	4,5 ± 0,4	4,4 ± 0,5	5,0 ± 0,4	0,6	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	17,2 ± 1,0	16,2 ± 0,8	16,9 ± 0,9	0,2	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	78,3 ± 1,3	79,4 ± 1,1	78,1 ± 1,2	0,3	n.s.
Nombre total de redressements	42,1 ± 2,4	36,8 ± 2,4	42,3 ± 2,8	1,2	n.s.
Redressements en ZP (%)	51,9 ± 2,0	61,8 ± 2,3 *	55,0 ± 2,9	4,1	<0,05

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets étudiés par l'ANOVA à 1 facteur sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

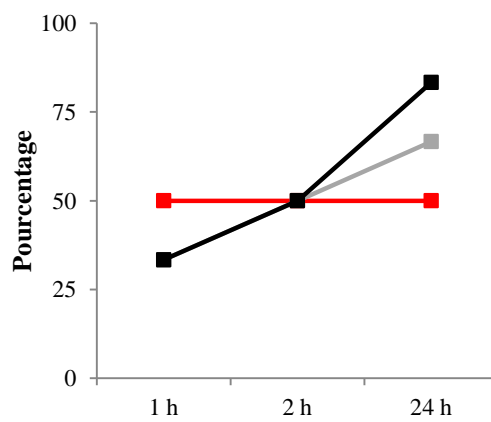
* : $p < 0,05$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (contendus)

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique



35c



■ Témoins
(contendus)

■ 1,5
ppb

■ 150
ppb

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

Figures 35a, 35b et 35c : Pourcentage de mères des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb ayant construit un nid à PN3 (35a), PN6 (35b) et PN9 (35c)

Tableau 50 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes

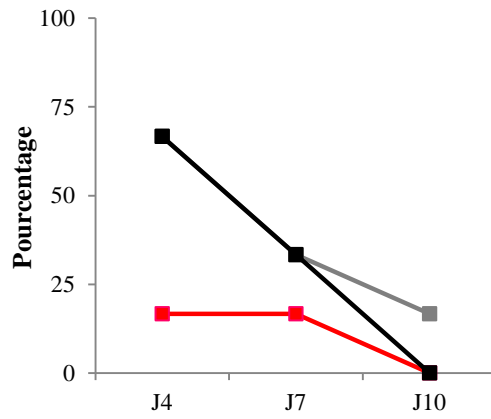
	J4	J7	J10	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour	
				F _[2,16]	p	F _[2,16]	p	F _[2,16]	p
Temps de 1 ^{er} ramassage (s)									
Témoins (contendus)	211,8 ± 76,6	407,8 ± 84,7	418,6 ± 132,0	1,5	n.s.	3,3	p=0,054	0,9	n.s.
1,5 ppb	78,4 ± 76,6	210,0 ± 84,7	305,0 ± 132,0						
150 ppb	168,6 ± 76,6	98,2 ± 84,7	217,4 ± 132,0						
Temps total de ramassage (s)									
Témoins (contendus)	389,7 ± 94,7	681,0 ± 157,6	540,0 ± 78,3	5,9	< 0,05	1,1	n.s.	0,8	n.s.
1,5 ppb	197,3 ± 82,0 *	190,3 ± 136,5 *	256,0 ± 67,8 *						
150 ppb	314,8 ± 82,0 ^a	394,5 ± 136,5 ^a	246,5 ± 67,8 ^a						
Temps consacré aux jeunes (s)									
Témoins (contendus)	381,6 ± 110,2	438,0 ± 141,3	578,6 ± 157,2	1,0	n.s.	1,1	n.s.	0,7	n.s.
1,5 ppb	615,0 ± 100,6	702,3 ± 129,0	593,5 ± 143,5						
150 ppb	584,7 ± 100,6	599,7 ± 129,0	765,3 ± 143,5						

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : p=0,084

* : p < 0,05 effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif



■ Témoins
(contendus)

■ 1,5
ppb

■ 150
ppb

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

Figure 36 : Pourcentage de mères des groupes Témoins (contendus), 1,5 et 150 ppb ayant construit un nid à PN4, PN7 et PN10

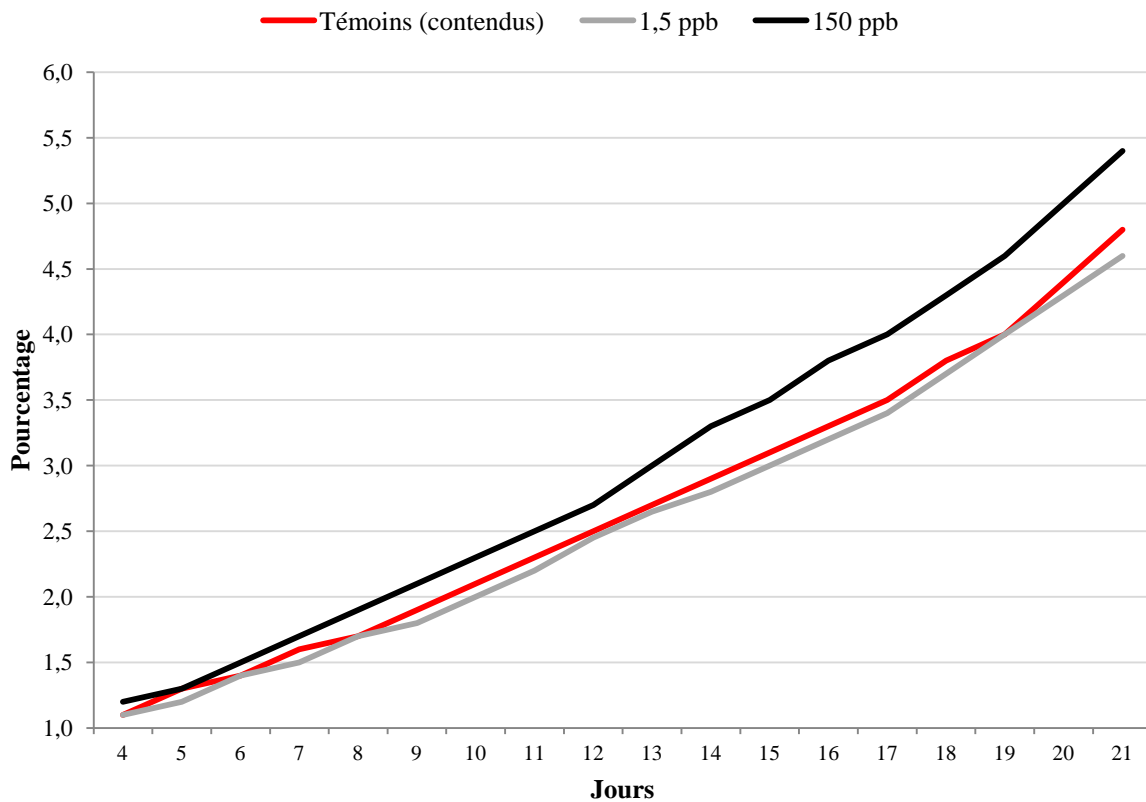


Figure 37 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des jeunes

III.2.3.4. Tests à l'âge adulte

a. Labyrinthe en croix surélevé

L'ANOVA à 2 facteurs a montré un effet de l'exposition postnatale au fluorène sur le comportement des animaux adultes dans le LCS (**Tableau 51**). Ainsi, les animaux exposés à 150 ppb de fluorène ont significativement effectué plus de redressements et montré un pourcentage plus important de *head-dipping* en BO comparé aux témoins (**Tableau 51**). De plus, un pourcentage significativement plus important de redressements effectués en BF a été relevé chez les rats exposés à 1,5 ppb de fluorène comparé aux témoins (**Tableau 51**).

Un effet du sexe a par ailleurs été montré, révélant que les femelles avaient significativement visité plus de BO et effectué plus de passages par la ZC que les mâles, avec pour conséquence un nombre significativement plus important d'entrées dans les branches du labyrinthe (**Tableau 51**). De plus, les femelles ont effectué plus de redressements que les mâles (**Tableau 51**). Par ailleurs, les femelles ont significativement passé plus de temps dans les BO et montré un pourcentage d'entrées en BO plus important que les mâles (**Tableau 51**).

Aucune interaction entre le fluorène et le sexe n'a été mise en évidence, sauf concernant les temps passés dans les BO et en ZC ainsi que le nombre de *head-dipping* dans les BO (**Tableau 51**). En particulier, les femelles exposées à 1,5 ppb de fluorène ont en particulier passé moins de temps dans les BO révélant ainsi un comportement plus anxieux que les mâles du même groupe (**Tableau 51**).

A 150 ppb de fluorène, les femelles se sont révélées moins anxieuses que les mâles du même groupe du fait qu'elles ont passé plus de temps dans les BO au détriment de la ZC et montré un pourcentage de *head-dipping* en BO plus important (**Tableau 51**).

b. Open-field

Dans ce test, les animaux exposés à 150 ppb de fluorène au cours de la lactation ont traversé plus de cases et effectué plus de redressements que les rats témoins et ceux exposés à 1,5 ppb de fluorène (**Tableau 52**). Par ailleurs, ces mêmes animaux ont passé plus de temps dans la ZI que ceux des deux autres groupes (**Tableau 52**).

Par ailleurs, des variations liées au sexe ont été observées dans ce test, montrant un degré d'activité plus important des femelles, reflété par un nombre plus important de cases traversées et de redressements comparé aux mâles (**Tableau 52**).

Enfin, aucune interaction entre ces deux facteurs n'a été mise en évidence par l'analyse des données (**Tableau 52**).

Tableau 51 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Entrées en BO	6,3 ± 0,7	8,8 ± 0,7	7,3 ± 0,7	7,9 ± 0,7	7,2 ± 0,7	10,3 ± 0,7	1,6	n.s.	11,8	<0,01	1,4	n.s.
Entrées en BF	8,1 ± 0,7	8,4 ± 0,7	8,3 ± 0,7	9,5 ± 0,7	8,0 ± 0,7	9,1 ± 0,7	0,4	n.s.	2,5	n.s.	0,3	n.s.
Nombre de passages en ZC	14,6 ± 1,0	17,3 ± 1,0	15,4 ± 1,1	17,7 ± 1,1	15,2 ± 1,1	19,4 ± 1,1	0,8	n.s.	12,3	<0,01	0,5	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	41,5 ± 3,1	51,4 ± 3,1	46,6 ± 2,9	45,3 ± 2,9	46,7 ± 2,9	53,3 ± 2,9	1,1	n.s.	4,4	<0,05	1,9	n.s.
Nombre total d'entrées	14,4 ± 1,0	17,2 ± 1,0	15,5 ± 1,1	17,4 ± 1,1	15,2 ± 1,1	19,3 ± 1,1	0,9	n.s.	11,1	<0,01	0,6	n.s.
Temps en BO (s)	104,0 ± 9,6	120,5 ± 9,6	114,0 ± 9,3	103,1 ± 9,3	104,0 ± 9,3	141,9 ± 9,3	1,3	n.s.	3,7	p=0,06	3,5	<0,05
Temps en BF (s)	131,8 ± 9,8	104,0 ± 9,8	122,7 ± 9,9	133,0 ± 9,9	123,3 ± 9,9	100,4 ± 9,9	1,3	n.s.	2,8	n.s.	2,2	n.s.
Temps en ZC (s)	64,0 ± 4,7	75,1 ± 4,7	63,1 ± 4,7	63,7 ± 4,7	72,5 ± 4,7	57,2 ± 4,7	0,9	n.s.	0,1	n.s.	4,0	<0,05
Nombre total de redressements	18,1 ± 1,6	19,3 ± 1,6	17,3 ± 1,7	18,8 ± 1,7	19,9 ± 1,7 *	25,2 ± 1,7 *	4,2	<0,05	3,7	p=0,058	0,9	n.s.
Redressements en BF (%)	80,0 ± 4,4	73,5 ± 4,4	82,6 ± 4,2 ^a	89,4 ± 4,2 ^a	78,1 ± 4,2	66,0 ± 4,2	5,6	<0,01	1,3	n.s.	2,6	p=0,082
Nombre total de head dipping	7,7 ± 1,1	8,6 ± 1,1	11,8 ± 1,4	9,4 ± 1,4	9,8 ± 1,4	10,5 ± 1,4	1,8	n.s.	0,0	n.s.	0,8	n.s.
Head dipping en BO (%)	64,0 ± 6,1	63,0 ± 6,1	78,7 ± 5,6 ^b	72,7 ± 5,6 ^b	65,6 ± 5,6 *	89,3 ± 5,6 *	3,7	<0,05	1,5	n.s.	4,0	<0,05

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test a posteriori de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : p=0,062 ; ^b : p=0,061

* : p < 0,05 effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

Tableau 52 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Temps en ZC (s)	19,9 ± 2,8	19,2 ± 2,8	26,0 ± 3,9	15,5 ± 3,9	22,8 ± 3,9	20,5 ± 3,9	0,15	n.s.	2,021	n.s.	0,925	n.s.
Temps en ZI (s)	23,1 ± 4,1	34,7 ± 4,1	30,7 ± 4,7	30,2 ± 4,7	38,8 ± 4,7 *	44,1 ± 4,7 *	4,173	<0,05	2,004	n.s.	0,825	n.s.
Temps en ZP (s)	257,0 ± 5,4	246,0 ± 5,4	243,2 ± 7,2	254,3 ± 7,2	238,4 ± 7,2	235,4 ± 7,2	2,3	n.s.	0,0	n.s.	1,2	n.s.
Nombre total de cases traversées	140,4 ± 10,5	187,7 ± 10,5	126,6 ± 9,9	175,5 ± 9,9	177,8 ± 9,9 *	197,6 ± 9,9 *	7,1	<0,01	23,0	<0,01	1,4	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	5,4 ± 0,8	6,1 ± 0,8	6,0 ± 0,8	5,8 ± 0,8	5,5 ± 0,8	6,2 ± 0,8	0,0	n.s.	0,3	n.s.	0,2	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	13,0 ± 1,6	17,9 ± 1,6	13,9 ± 1,5	16,2 ± 1,5	16,3 ± 1,5	19,2 ± 1,5	1,9	n.s.	7,5	<0,01	0,4	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	81,6 ± 2,2	76,0 ± 2,2	80,1 ± 2,1	78,0 ± 2,1	78,2 ± 2,1	74,6 ± 2,1	1,0	n.s.	4,9	<0,05	0,4	n.s.
Nombre total de redressements	22,8 ± 3,8	30,8 ± 3,8	18,8 ± 4,0	26,3 ± 4,0	26,6 ± 4,0	41,3 ± 4,0	4,2	<0,05	9,6	<0,01	0,5	n.s.
Redressements en ZP (%)	96,6 ± 2,6	87,5 ± 2,6	96,1 ± 2,6	93,2 ± 2,6	92,2 ± 2,6 ^a	81,4 ± 2,6 ^a	4,9	<0,01	13,1	<0,01	1,3	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$ effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

c. Boîte claire/obscur

Le traitement statistique des données dans ce test a montré un effet de l'exposition précoce au fluorène sur le temps de 1^{ère} sortie dans le CC, indiquant que les animaux exposés à 150 ppb de fluorène sont sortis plus rapidement du CS pour explorer le CC que les rats exposés à 1,5 ppb (Tableau 53). Une tendance statistique a également été observée concernant le temps passé dans le CC, montrant que les rats traités à 150 ppb y ont passé plus de temps que les animaux des deux autres groupes (Tableau 53).

Par ailleurs, un effet du sexe a été observé sur l'ensemble des variables relevées dans ce test (Tableau 53). Comparées aux mâles, les femelles sont sorties plus rapidement dans le CC, ont passé plus de temps et effectué plus de redressements dans cette zone du labyrinthe, ont effectué plus de transitions entre les deux compartiments et ont été moins hésitantes quant au fait d'explorer le CC (Tableau 53).

Par contre, aucune interaction n'a été observée entre ces deux facteurs quelque soit la variable étudiée (Tableau 53).

d. Labyrinthe en Y

Aucune modification du pourcentage d'alternance n'a été observée dans ce test, suggérant que l'exposition postnatale au fluorène n'a pas d'effets à long terme sur la mémoire immédiate des animaux (Tableau 54). Seul un effet du polluant a été mis en évidence sur l'activité des animaux durant la 1^{ère} minute de test, reflétée par une augmentation du nombre de branches visitées chez les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène par rapport aux témoins lors de cette période (Tableau 54).

e. Labyrinthe radial à 8 branches

L'ANOVA à 3 facteurs réalisée sur les données relevées dans ce test n'a mis en évidence aucun effet du facteur lié au fluorène, alors qu'un effet du sexe a été observé (Tableau 55).

De plus, l'analyse des performances des animaux a montré qu'ils ont globalement amélioré leurs performances au cours des 10 jours de test (Tableau 55).

Au niveau des interactions entre les différents facteurs, seuls des effets d'interaction entre l'exposition au fluorène et le sexe, et entre le sexe et la répétition du test ont été observés (Tableau 55). Les femelles exposées au fluorène au cours de l'allaitement ont ainsi mis plus de temps pour visiter les 8 branches du labyrinthe, ont fait plus d'erreurs, ont visité moins de branches avant la 1^{ère} erreur et ont parcouru moins de branches par minute comparées aux femelles témoins contrairement à l'observation

Tableau 53 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Temps de 1ère sortie dans le CC (s)	53,5 ± 23,9	41,1 ± 22,8	78,7 ± 10,9	55,9 ± 9,9	45,6 ± 10,4	30,8 ± 10,4	4,1	<0,05	3,8	p=0,056	0,1	n.s.
Temps dans le CC (s)	63,0 ± 12,9	82,5 ± 12,9	50,6 ± 10,7	75,6 ± 10,7	72,0 ± 10,7	102,9 ± 10,7	2,6	p=0,079	8,3	<0,01	0,1	n.s.
Nombre d'alternances	8,8 ± 1,8	10,9 ± 1,8	6,7 ± 1,5	10,8 ± 1,5	10,0 ± 1,5	11,7 ± 1,5	1,0	n.s.	4,8	<0,05	0,4	n.s.
Tentatives d'entrées dans le CC	6,4 ± 0,7	3,7 ± 0,7	6,5 ± 0,7	4,3 ± 0,7	6,1 ± 0,7	2,8 ± 0,7	1,0	n.s.	23,7	<0,01	0,3	n.s.
Redressements	7,8 ± 2,3	14,3 ± 2,3	5,3 ± 2,0	12,2 ± 2,0	9,4 ± 2,0	15,9 ± 2,0	2,0	n.s.	16,8	<0,01	0,0	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif

Abréviation : CC, compartiment clair

Tableau 54 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y

	Témoins (contendus)		1,5 ppb		150 ppb		Groupe		Sexe		Groupe × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Alternance spontanée (%)	64,1 ± 2,5	60,3 ± 2,5	62,1 ± 2,6	65,3 ± 2,6	67,8 ± 2,6	60,5 ± 2,6	0,3	n.s.	1,5	n.s.	2,1	n.s.
Nombre total de branches visitées	31,2 ± 2,5	44,4 ± 2,5	33,6 ± 2,1	41,1 ± 2,1	36,3 ± 2,1	38,3 ± 2,1	0,0	n.s.	20,4	<0,01	3,7	<0,05
Nombre de branches visitées (1 ^{ère})	5,6 ± 0,4	6,4 ± 0,4	6,4 ± 0,4 *	7,5 ± 0,3 *	6,0 ± 0,4	6,5 ± 0,4	3,8	<0,05	8,5	<0,01	0,4	n.s.
Redressements	75,3 ± 5,7	102,6 ± 5,7	76,8 ± 5,1	95,5 ± 5,1	87,5 ± 5,1	102,2 ± 5,1	1,5	n.s.	23,6	<0,01	0,8	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante. Le test *a posteriori* de Dunnett a été utilisé pour comparaisons multiples.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ effet statistiquement significatif du Groupe

n.s. : non significatif

Tableau 55 : Effets de l'inhalation répétée de fluorène par la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches

	Jour 1		Jour 4		Jour 7		Jour 10	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Temps total (s)								
Témoins (contendus)	98,4 ± 12,5	76,8 ± 12,5	61,2 ± 6,6	43,4 ± 6,6	49,0 ± 4,9	33,7 ± 4,9	46,9 ± 4,3	23,7 ± 4,3
1,5 pbb	80,2 ± 13,1	71,3 ± 12,0	60,0 ± 6,9	43,8 ± 6,3	41,7 ± 5,2	41,4 ± 4,7	40,0 ± 4,5	28,6 ± 4,2
150 pbb	82,8 ± 12,5	97,3 ± 12,5	37,8 ± 6,6	53,8 ± 6,6	37,1 ± 4,9	37,5 ± 4,9	36,4 ± 4,3	35,7 ± 4,3
Nombre total de branches visitées								
Témoins (contendus)	11,9 ± 1,0	12,3 ± 1,0	11,5 ± 0,8	10,3 ± 0,8	10,1 ± 0,7	9,9 ± 0,7	9,1 ± 0,4	8,3 ± 0,4
1,5 pbb	11,6 ± 1,1	11,3 ± 1,0	12,0 ± 0,9	11,0 ± 0,8	10,0 ± 0,7	10,1 ± 0,7	8,7 ± 0,4	9,2 ± 0,4
150 pbb	12,3 ± 1,0	14,3 ± 1,0	10,0 ± 0,8	12,3 ± 0,8	9,4 ± 0,7	10,4 ± 0,7	8,7 ± 0,4	9,9 ± 0,4
Nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur								
Témoins (contendus)	4,5 ± 0,5	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,1 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,2 ± 0,5	7,3 ± 0,4	7,6 ± 0,4
1,5 pbb	5,0 ± 0,5	4,4 ± 0,5	5,6 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,1 ± 0,5	7,1 ± 0,4	6,6 ± 0,4
150 pbb	5,9 ± 0,5	5,1 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,0 ± 0,5	7,1 ± 0,5	6,1 ± 0,5	7,5 ± 0,4	6,1 ± 0,4
Nombre de branches visitées / min								
Témoins (contendus)	8,6 ± 0,8	10,0 ± 0,8	13,1 ± 1,2	15,2 ± 1,2	13,8 ± 1,2	18,4 ± 1,2	13,9 ± 1,4	21,6 ± 1,4
1,5 pbb	9,4 ± 0,8	9,9 ± 0,7	14,2 ± 1,3	15,9 ± 1,2	16,7 ± 1,3	16,3 ± 1,2	14,4 ± 1,5	21,2 ± 1,3
150 pbb	9,9 ± 0,8	10,2 ± 0,8	17,0 ± 1,2	14,6 ± 1,2	16,0 ± 1,2	17,2 ± 1,2	15,3 ± 1,4	19,1 ± 1,4

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ effet statistiquement significatif du Groupe

	Groupe		Sexe		Jour de test		Groupe × Sexe		Groupe × Jour		Sexe × Jour		Groupe × Sexe × Jour	
	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p	F _[2,71]	p
Temps total (s)	0,7	n.s.	0,2	n.s.	24,5	<0,01	6,5	<0,01	0,7	n.s.	4,1	<0,01	0,7	n.s.
Nombre total de branches visitées	0,8	n.s.	3,8	p=0,056	12,5	<0,01	2,6	p=0,084	0,8	n.s.	1,5	n.s.	0,8	n.s.
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur	0,3	n.s.	5,0	<0,05	13,9	<0,01	2,4	p=0,097	1,5	p=0,093	1,3	n.s.	1,4	n.s.
Nombre de branches visitées / min	0,5	n.s.	3,8	p=0,056	29,6	<0,01	3,7	<0,05	0,6	n.s.	7,9	<0,01	0,9	n.s.

Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

faite chez les mâles où les animaux exposés au polluant ont globalement été plus performants que les rats témoins (**Tableau 55**). L'interaction entre le sexe et le jour de test a montré que les femelles ont amélioré leurs performances plus rapidement que les mâles au cours de la période de test (**Tableau 55**).

III.2.4. Effets du stress de contention

III.2.4.1. Tests neurodéveloppementaux

Dans le test de retournement, les jeunes élevés par des femelles contendues au cours de la période d'allaitement, ont été plus rapides que les témoins libres de se mouvoir pour se retourner à PN4, alors qu'au cours des deux autres jours de test, aucune différence n'a été observée entre les groupes (**Tableau 56**). De même, aucune différence concernant les pourcentages de réussite au test n'a été mise en évidence (**Tableau 56**). Concernant l'évolution des performances, seuls les animaux élevés par des femelles exposées à la contention ont montré une amélioration significative du temps mis pour se retourner au cours des trois jours (Témoins (contendus) : $F=13,5$; $p=0,001$).

Les résultats au test d'agrippement ont montré une différence entre les deux groupes à PN5, indiquant que les jeunes rats élevés par des femelles placées en contention s'agrippent plus longtemps que les témoins libres de se mouvoir au grillage (**Tableau 56**). Au plan des pourcentages de réussite au test, un plus grand nombre de jeunes issus de mères contendues a réussi à s'agripper jusqu'à 90° à PN4 et PN5 comparé aux témoins (**Tableau 56**). L'analyse des performances sur les trois jours de test a également montré que les animaux des deux groupes ont amélioré leurs performances (Témoins (non contendus) : $F=24,3$; $p=0,000$; Témoins (contendus) : $F=10,6$; $p=0,005$).

Dans le test du *cliff avoidance*, une différence entre les deux groupes a été observée à PN5, indiquant que les jeunes élevés par les femelles placées en contention ont mis plus de temps que les témoins à se rétablir sur la plate-forme (**Tableau 56**). En revanche, au cours des deux jours suivants, plus aucune différence n'a été observée entre les deux groupes (**Tableau 56**). En terme de pourcentages de réussite, un plus grand nombre d'animaux élevés par des mères placées en contention a réussi le test à PN7 comparé aux témoins (**Tableau 56**). Une amélioration des performances a cependant été observée dans les deux groupes d'animaux au cours de la période de test (Témoins (non contendus) : $F=7,3$; $p=0,026$; Témoins (contendus) : $F=37,2$; $p=0,000$).

Dans le test de la réaction anti-gravitaire, les jeunes élevés par des femelles allaitantes placées en contention ont été plus rapides que les témoins à effectuer la rotation de 180°, mais uniquement à PN9

Tableau 56 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur le développement sensori-moteur du jeune rat

	Témoins (non contenus)			Témoins (contendus)		
	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour	1 ^{er} jour	2 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour
Retournement						
temps (s)	10,0 (4,5 - 19,0)	7,4 (3,3 - 21,7)	5,3 (3,5 - 10,0)	10,0 (3,5 - 24,0)	4,1 ** (2,7 - 8,7)	4,3 (2,5 - 9,6)
réussite (%)	100	100	100	98,3	100	100
Agrippement						
angle (°)	67 (56 - 80)	80,5 (65 - 92,5)	86,5 (75,8 - 109)	84,0 (69,3 - 94)	92 ** (80,3 - 108,5)	90 (80 - 100)
réussite (%)	8,0	30,0	42,9	40,0 ●●	56,7 ●●	53,3
Cliff avoidance						
temps (s)	5,2 (4,1 - 12,3)	12,6 (5,7 - 21,5)	5,9 (3,5 - 12,6)	22,5 ** (15,5 - 27,7)	8,3 (4,2 - 11,5)	5,1 (2,4 - 9,5)
réussite (%)	20,0	40,0	42,0	10,0	41,7	63,3 ●●
Réaction anti-gravitaire						
temps (s)	27,3 (20,1 - 43,8)	19,7 (14,0 - 34,7)	13,8 (8,2 - 18,8)	28,7 (17,9 - 41,5)	14,9 * (10,1 - 26,4)	17,5 (9,9 - 25,3)
réussite (%)	98,0	100	100	98,3	100	100
Suspension						
temps (s)		10,3 (5,9 - 19,4)			10,2 (5,0 - 19,5)	
Coordination locomotrice						
temps de nage (s)	42,0 (32,0 - 64,5)	13,5 ▲▲ (9,8 - 19,0)	6,0 ▲▲▲▲ (4,0 - 10,0)	43,0 (33,0 - 54,0)	11,5 ▲▲ (6,0 - 19,0)	5,0 ▲▲▲▲ (3,0 - 10,0)
temps de grimpe (s)	12,0 (10,0 - 16,0)	7,0 ▲▲ (5,0 - 11,3)	5,0 ▲▲▲▲ (4,0 - 7,0)	16,0 (11,0 - 24,0)	9,0 *▲▲ (7,0 - 14,0)	7,0 **▲▲▲▲ (6,0 - 11,0)
temps de rétablissement sur la plate-forme (s)	16,0 (8,5 - 27,0)	6,0 ▲▲ (4,0 - 11,5)	4,0 ▲▲▲▲ (3,0 - 8,0)	9,0 ** (7,0 - 13,0)	5,5 ^a ▲▲ (4,0 - 9,0)	5,0 ▲▲ (3,0 - 8,0)
temps total (s)	75,0 (60,5 - 96,5)	30,0 ▲▲ (21,5 - 40,3)	18,0 ▲▲▲▲ (13,0 - 23,0)	73,0 (51,0 - 94,0)	26,0 ▲▲ (20,0 - 37,3)	19,0 ▲▲▲▲ (14,0 - 27,0)
réussite (%)	84,0	100	94,0	85,0	93,3 ^b	100 ^c

Les résultats sont présentés sous forme de médianes, les rangs étant indiqués entre parenthèses, et de pourcentages moyens. Le Khi-deux de Pearson, le test de Mann-Whitney et le test de Friedman ont été réalisés pour comparer les animaux des deux groupes. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparaisons multiples.

^a : p=0,074 ; ^b : p=0,082 ; ^c : p=0,093

* : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contenus)

●● : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contenus)

▲ : p < 0,05 ; ▲▲ : p < 0,01 différence statistiquement significative par rapport au 1^{er} jour de test

Δ : $p < 0,05$; $\Delta\Delta$: $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport au 2^{ème} jour de test

(Tableau 56). Aucune différence concernant le pourcentage de réussite au test n'a été observée entre les deux groupes au cours des trois jours de test (Tableau 56). Par ailleurs, tous les animaux ont significativement amélioré leurs performances tout au long de la période de test (Témoins (non contenus) : $F=18,0$; $p=0,000$; Témoins (contendus) : $F=17,2$; $p=0,000$).

Les résultats obtenus au test de suspension réalisé à PN10 n'ont montré aucune différence entre les deux groupes (Tableau 56).

Concernant la maturation des systèmes sensoriels, un nombre plus important de jeunes élevés par des femelles placées en contention a été réactif à la stimulation sonore à PN12 et PN13 (Figure 38) et a eu les yeux ouverts à PN14 et PN15 comparé aux témoins (Figure 39).

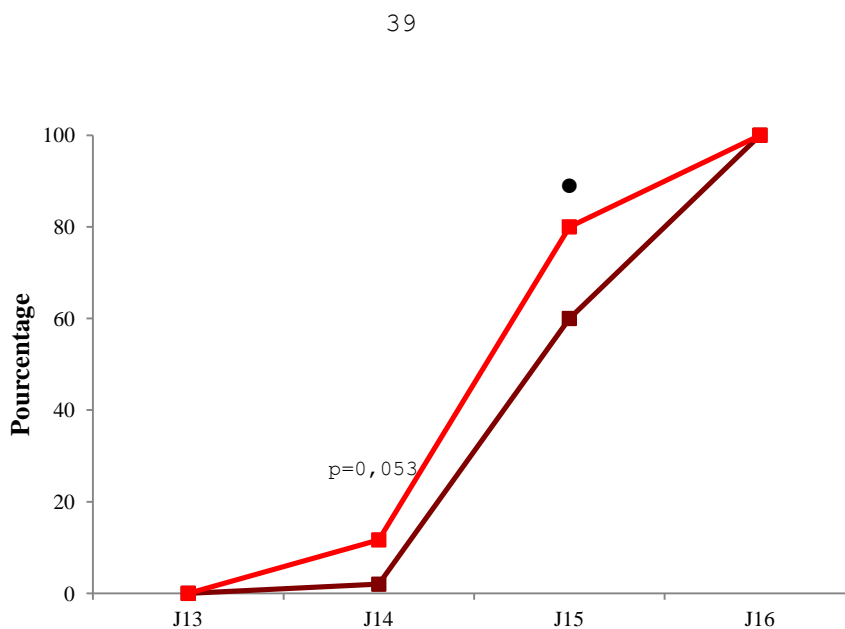
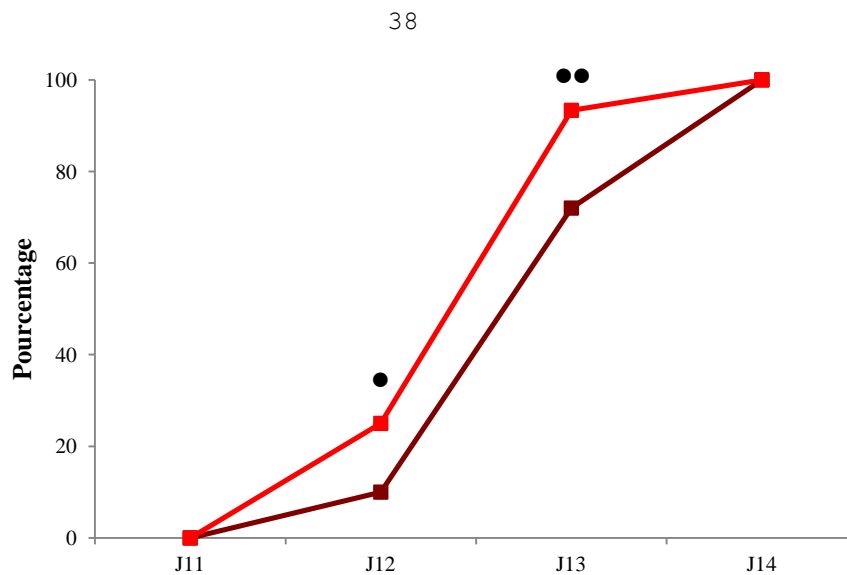
Dans le test de la coordination locomotrice, le temps mis pour réussir le test et le pourcentage de réussite ont été identiques entre les groupes au cours des trois jours de test (Tableau 56). Concernant les différentes phases du test, les jeunes élevés par des mères placées en contention ont mis plus de temps à escalader la tige à PN20 et PN21 que les témoins libres de se mouvoir (Tableau 56). Par contre, ces mêmes animaux ont été plus rapides à se rétablir sur la plate-forme à PN19 et PN20 (Tableau 56). L'analyse des performances au cours des trois jours de test a montré une amélioration significative du temps mis pour réaliser le test (Témoins (non contenus) : $F=62,0$; $p=0,000$; Témoins (contendus) : $F=71,8$; $p=0,000$), ainsi que du temps mis pour se rétablir sur la plate-forme (Témoins (non contenus) : $F=31,1$; $p=0,000$; Témoins (contendus) : $F=28,4$; $p=0,000$) (Tableau 56).

A PN25, les animaux nés des femelles exposées à la contention ont passé plus de temps en ZI et moins de temps en ZP comparés aux témoins libres de se mouvoir (Tableau 57). Dans le même temps, ils ont traversé plus de cases que les rats libres de se mouvoir (Tableau 57). Pour autant, ils ont proportionnellement traversé plus de cases en ZI et moins en ZP (Tableau 57). Ils ont également effectué plus de redressements et montré proportionnellement un pourcentage de redressements en ZP moins important que les témoins (Tableau 57).

III.2.4.2. Comportement maternel

L'analyse des observations faites à l'issue du test de construction du nid à PN3, PN6 et PN9 n'a révélé aucune différence entre les mères des deux groupes témoins (Figures 40a, 40b et 40c).

En revanche, l'ANOVA à 2 facteurs réalisée sur les données relevées dans le test du ramassage des



■ Témoins (non contenus)

■ Témoins (contenus)

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des trois groupes.

● : $p < 0,05$; ●● : $p < 0,01$ effets statistiquement significatifs

Figures 38 et 39 : Pourcentage d'animaux des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) présentant une réactivité au bruit entre PN11 et PN14 (38) et ayant les yeux ouverts entre PN13 et PN16 (39)

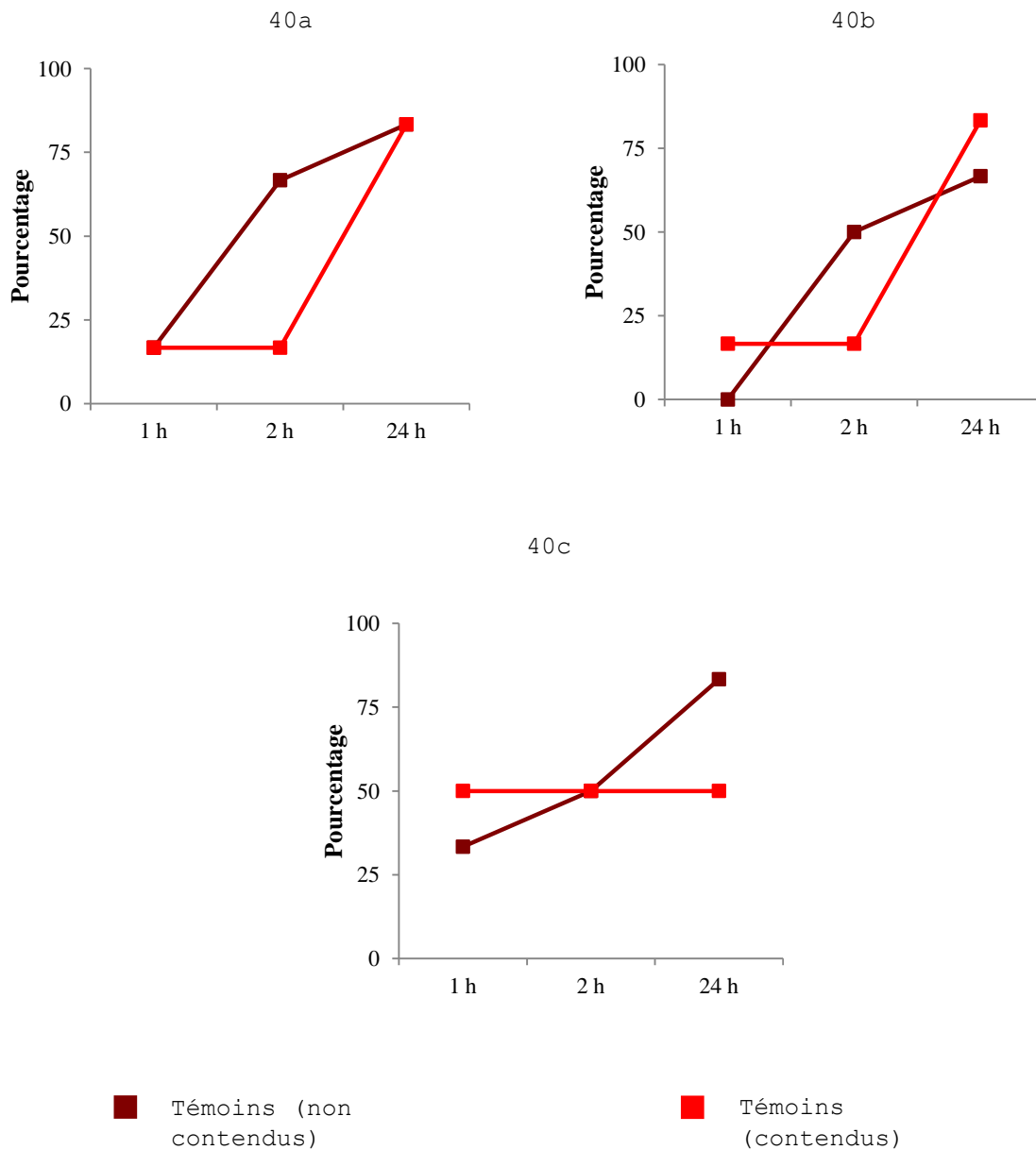
Tableau 57 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du jeune rat dans l'open-field à PN25

	Témoins (non contendus)	Témoins (contendus)
Temps en ZC (s)	9,6 ± 1,3	9,2 ± 1,0
Temps en ZI (s)	21,9 ± 2,3	33,3 ± 2,5 **
Temps en ZP (s)	268,5 ± 3,2	257,6 ± 2,9 *
Nombre total de cases traversées	105,0 ± 5,8	124,3 ± 4,1 **
Cases traversées en ZC (%)	4,9 ± 0,5	4,5 ± 0,4
Cases traversées en ZI (%)	12,9 ± 1,1	17,2 ± 1,0 **
Cases traversées en ZP (%)	82,3 ± 1,4	78,3 ± 1,3 *
Nombre total de redressements	30,3 ± 3,2	42,1 ± 2,4 **
Redressements en ZP (%)	69,7 ± 3,2	51,9 ± 2,0 **

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ différence statistiquement significative par rapport aux Témoins (non contendus)

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique



Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

Figures 40a, 40b et 40c : Pourcentage de mères des groupes Témoins (non contendus) et Témoins (contendus) ayant construit un nid à PN3 (40a), PN6 (40b) et PN9 (40c)

jeunes a montré un effet du stress postnatal de contention sur le comportement maternel. Ainsi, les mères placées en contention ont été moins rapides que les femelles libres de se mouvoir à ramasser un 1^{er} jeune et à regrouper l'ensemble de la portée au cours des trois jours de test (**Tableau 58**). Un effet significatif du jour de test sur le temps de 1^{er} ramassage a également été observé entre les deux groupes, montrant que l'ensemble des femelles a, au fil des jours, de plus en plus tardé à entreprendre le regroupement des jeunes (**Tableau 58**). Concernant la qualité de construction du nid, une différence est apparue à PN4 entre les deux groupes, montrant une moindre aptitude des mères placées en contention à construire un nid bien structuré (**Figure 41**). Cette différence n'a plus ensuite été observée (**Figure 41**).

III.2.4.3. Poids corporel

L'analyse du pourcentage de variation du poids corporel a montré que les animaux de mères contendues en période postnatale ont pris moins de poids que les jeunes issus de mères libres de se mouvoir durant les trois premières semaines de vie postnatale (**Figure 42**).

III.2.4.4. Tests à l'âge adulte

a. Labyrinthe en croix surélevé

Dans ce test, les rats élevés par des mères placées en contention au cours de la période d'allaitement ont significativement visité moins de branches et effectué moins de passages en ZC par rapport aux animaux libres de se mouvoir (**Tableau 59**). Ils ont eu également tendance à effectuer moins d'entrées en BO et proportionnellement à réaliser moins de *head-dipping* en BO comparés aux témoins (**Tableau 59**). Un effet du sexe sur l'activité des animaux a été aussi observé, indiquant que les femelles paraissent moins sensibles aux effets de la contention (**Tableau 59**).

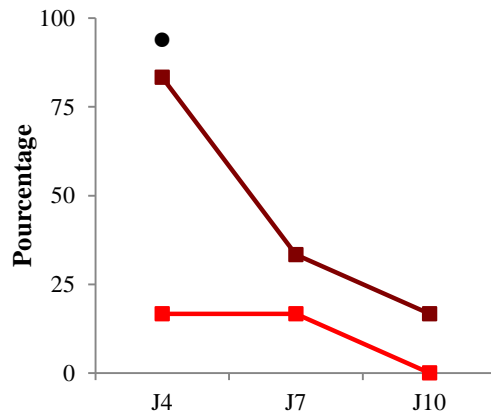
Une interaction entre ces deux facteurs a également été mise en évidence concernant le pourcentage d'entrées en BO et le nombre total de *head-dipping*, indiquant que les femelles élevées par des mères exposées à la contention ont été sensiblement plus actives et moins anxieuses que les femelles libres de se mouvoir (**Tableau 59**). Concernant les mâles, ce sont des résultats inverses qui ont été observés (**Tableau 59**). Pour autant, il faut signaler que ces interactions ne sont pas statistiquement significatives ($p=0,081$ dans les deux cas) (**Tableau 59**).

Tableau 58 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur le comportement maternel de ramassage des jeunes

	J4	J7	J10	Groupe		Jour de test		Groupe × Jour		
				F _[1, 10]	p	F _[1, 10]	p	F _[1, 10]	p	
Temps de 1 ^{er} ramassage (s)										
Témoins (non contenus)	74,3 ± 42,0	102,8 ± 68,5	224,7 ± 82,9	4,6	p=0,06	7,0	<0,01	1,6	n.s.	
Témoins (contendus)	211,8 ± 76,6	407,8 ± 84,7	418,6 ± 132,0							
Temps total de ramassage (s)										
Témoins (non contenus)	211,6 ± 84,2	316,0 ± 137,9	203,0 ± 57,4	11,5	<0,05	1,4	n.s.	0,4	n.s.	
Témoins (contendus)	389,7 ± 94,7	681,0 ± 157,6	540,0 ± 78,3							
Temps consacré aux jeunes (s)										
Témoins (non contenus)	622,2 ± 104,8	571,8 ± 135,5	617,2 ± 132,6	1,1	n.s.	0,5	n.s.	0,4	n.s.	
Témoins (contendus)	381,6 ± 110,2	438,0 ± 141,3	578,6 ± 157,2							

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif



■ Témoins (non contenus)

■ Témoins (contenus)

Le Khi-deux de Pearson a été réalisé pour comparer les animaux des deux groupes.

● : $p < 0,05$ effets statistiquement significatifs

Figure 41 : Pourcentage de mères des groupes Témoins (non contenus) et Témoins (contenus) ayant construit un nid à PN4, PN7 et PN10

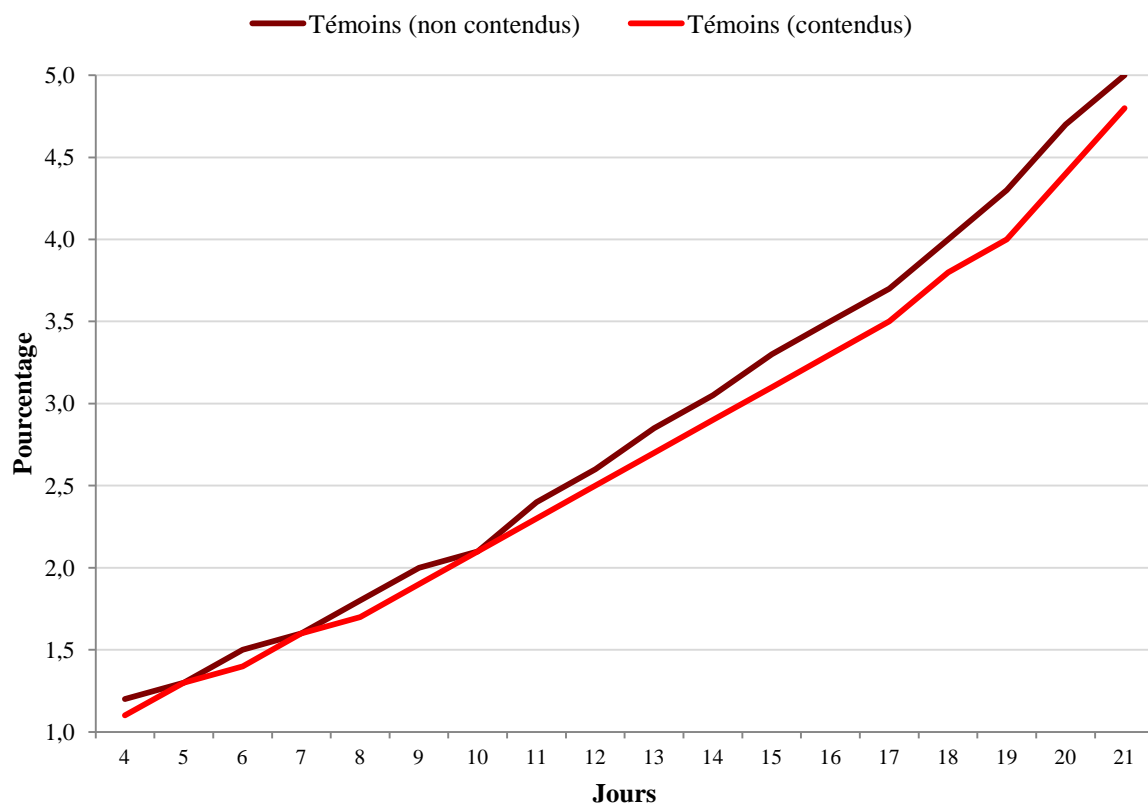


Figure 42 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'évolution du pourcentage de variation de la prise de poids des jeunes

Tableau 59 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en croix surélevé

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Entrées en BO	8,5 ± 0,8	9,1 ± 0,7	6,3 ± 0,7	8,8 ± 0,7	2,9	p=0,099	3,8	p=0,056	1,6	n.s.
Entrées en BF	8,5 ± 0,7	9,3 ± 0,7	8,1 ± 0,7	8,4 ± 0,7	0,9	n.s.	0,8	n.s.	0,2	n.s.
Nombre de passages en ZC	17,9 ± 1,1	18,8 ± 1,0	14,6 ± 1,0	17,3 ± 1,0	5,3	<0,05	2,8	n.s.	0,7	n.s.
Pourcentages d'entrées en BO	50,4 ± 3,2	49,0 ± 3,1	41,5 ± 3,1	51,4 ± 3,1	1,1	n.s.	1,8	n.s.	3,2	p=0,081
Nombre total d'entrées	17,6 ± 1,1	18,4 ± 1,0	14,4 ± 1,0	17,2 ± 1,0	4,5	<0,05	2,9	p=0,096	0,9	n.s.
Temps en BO (s)	111,0 ± 10,0	118,9 ± 9,6	104,0 ± 9,6	120,5 ± 9,6	0,1	n.s.	1,6	n.s.	0,2	n.s.
Temps en BF (s)	119,0 ± 10,3	115,0 ± 9,8	131,8 ± 9,8	104,0 ± 9,8	0,0	n.s.	2,6	n.s.	1,4	n.s.
Temps en ZC (s)	69,7 ± 4,9	65,8 ± 4,7	64,0 ± 4,7	75,1 ± 4,7	0,1	n.s.	0,6	n.s.	2,5	n.s.
Nombre total de redressements	17,5 ± 1,7	18,4 ± 1,6	18,1 ± 1,6	19,3 ± 1,6	0,2	n.s.	0,4	n.s.	0,0	n.s.
Redressements en BF (%)	76,2 ± 4,6	80,1 ± 4,4	80,0 ± 4,4	73,5 ± 4,4	0,1	n.s.	0,1	n.s.	1,4	n.s.
Nombre total de head dipping	10,9 ± 1,1	8,0 ± 1,1	7,7 ± 1,1	8,6 ± 1,1	1,5	n.s.	0,9	n.s.	3,2	p=0,081
Head dipping en BO (%)	76,0 ± 6,3	72,9 ± 6,1	64,0 ± 6,1	63,0 ± 6,1	3,2	p=0,083	0,1	n.s.	0,0	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviations : BO, branches ouvertes; BF, branches fermées; ZC, zone centrale

b. Open-field

Aucun effet de la contention sur le comportement des animaux adultes n'a été observé dans ce test (**Tableau 60**).

En revanche, un effet du sexe a été observé sur plusieurs variables, indiquant que les femelles ont significativement traversé un plus grand nombre de cases que les mâles, en particulier au niveau du nombre de cases traversées et du temps passé dans la ZI (**Tableau 60**).

Enfin, aucune interaction entre ces deux facteurs n'a été révélée par le traitement des données (**Tableau 60**).

c. Boîte claire/obscur

L'ANOVA à 2 facteurs a montré un effet de la contention sur l'activité des animaux, qui s'est traduit par une diminution du temps mis pour entrer dans le CC chez les animaux élevés par les mères placées en contention comparés aux rats libres de se mouvoir (**Tableau 61**).

Un effet du sexe a également été mis en évidence. Comparées aux mâles, les femelles ont été significativement moins hésitantes quant à l'exploration du CC et ont effectué plus de redressements dans ce compartiment (**Tableau 61**).

Enfin, aucune interaction entre ces deux facteurs (« Contention » et « Sexe ») n'a été révélée par l'analyse des données relevées (**Tableau 61**).

d. Labyrinthe en Y

Le traitement des données relevées dans ce test n'a montré aucun effet de la contention imposée aux mères allaitantes sur le comportement des animaux adultes (**Tableau 62**).

Par contre, un effet du sexe a été observé sur différentes variables, indiquant que les femelles ont significativement visité plus de branches au cours de la 1^{ère} minute, ont un niveau d'activité moyen plus élevé et ont effectué plus de redressements comparé aux mâles (**Tableau 62**).

Par ailleurs, aucune interaction entre ces deux facteurs n'a été observée (**Tableau 62**).

e. Labyrinthe radial à 8 branches

Dans ce test, aucun effet de la contention ou du sexe n'a été observé au cours des 10 jours de test (**Tableau 63**). En revanche, un effet du jour de test a été mis en évidence sur les quatre variables relevées, indiquant que l'ensemble des animaux a amélioré ses performances au cours de la période de test

Tableau 60 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans l'open-field

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Temps en ZC (s)	18,7 ± 2,8	16,8 ± 2,8	19,9 ± 2,8	19,2 ± 2,8	0,4	n.s.	0,2	n.s.	0,1	n.s.
Temps en ZI (s)	27,5 ± 4,1	33,4 ± 4,1	23,1 ± 4,1	34,7 ± 4,1	0,1	n.s.	4,5	<0,05	0,5	n.s.
Temps en ZP (s)	253,7 ± 5,4	149,8 ± 5,4	257,0 ± 5,4	246,0 ± 5,4	0,0	n.s.	1,9	n.s.	0,4	n.s.
Nombre total de cases traversées	153,0 ± 10,5	170,8 ± 10,5	140,4 ± 10,5	187,7 ± 10,5	0,0	n.s.	9,5	<0,01	2,0	n.s.
Cases traversées en ZC (%)	5,0 ± 0,8	5,1 ± 0,8	5,4 ± 0,8	6,1 ± 0,8	0,8	n.s.	0,2	n.s.	0,2	n.s.
Cases traversées en ZI (%)	14,5 ± 1,6	16,0 ± 1,6	13,0 ± 1,6	17,9 ± 1,6	0,0	n.s.	3,9	p=0,055	1,2	n.s.
Cases traversées en ZP (%)	80,4 ± 2,2	78,9 ± 2,2	81,6 ± 2,2	76,0 ± 2,2	0,2	n.s.	2,7	n.s.	0,9	n.s.
Nombre total de redressements	23,4 ± 3,8	24,3 ± 3,8	22,8 ± 3,8	30,8 ± 3,8	0,6	n.s.	1,4	n.s.	0,9	n.s.
Redressements en ZP (%)	93,9 ± 2,6	91,4 ± 2,6	96,6 ± 2,6	87,5 ± 2,6	0,1	n.s.	5,0	<0,05	1,5	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviations : ZC, zone centrale; ZI, zone intermédiaire; ZP, zone périphérique

Tableau 61 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans la boîte claire/obscur

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Temps de 1 ^{ère} sortie dans le CC (s)	115,8 ± 21,9	70,9 ± 21,9	53,5 ± 23,9	41,1 ± 22,8	4,1	<0,05	1,6	n.s.	0,5	n.s.
Temps dans le CC (s)	59,7 ± 12,9	75,5 ± 12,9	63,0 ± 12,9	82,5 ± 12,9	0,2	n.s.	1,8	n.s.	0,0	n.s.
Nombre d'alternances	8,1 ± 1,8	9,9 ± 1,8	8,8 ± 1,8	10,9 ± 1,8	0,2	n.s.	1,2	n.s.	0,0	n.s.
Tentatives d'entrées dans le CC	5,9 ± 0,7	3,2 ± 0,7	6,4 ± 0,7	3,7 ± 0,7	0,6	n.s.	16,6	<0,01	0,0	n.s.
Redressements	8,0 ± 2,3	11,4 ± 2,3	7,8 ± 2,3	14,3 ± 2,3	0,3	n.s.	4,7	<0,05	0,5	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Abréviation : CC, compartiment clair

Tableau 62 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe en Y

	Témoins (non contenus)		Témoins (contenus)		Contention		Sexe		Contention × Sexe	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p	F _[1, 47]	p
Alternance spontanée (%)	63,2 ± 2,5	62,9 ± 2,5	64,1 ± 2,5	60,3 ± 2,5	0,1	n.s.	0,4	n.s.	0,5	n.s.
Nombre total de branches visitées	34,5 ± 2,4	40,3 ± 2,5	31,2 ± 2,5	44,4 ± 2,5	0,0	n.s.	14,7	<0,01	2,2	n.s.
Nombre de branches visitées (1 ^{ère})	5,7 ± 0,4	7,4 ± 0,4	5,6 ± 0,4	6,4 ± 0,4	1,9	n.s.	10,6	<0,01	1,3	n.s.
Redressements	83,8 ± 5,7	94,0 ± 5,7	75,3 ± 5,7	102,6 ± 5,7	0,0	n.s.	10,9	<0,01	2,3	n.s.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M. Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

Tableau 63 : Effets du stress de contention de la rate allaitante sur l'activité comportementale du rat adulte dans le labyrinthe radial à 8 branches

	Jour 1		Jour 4		Jour 7		Jour 10	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Temps total (s)								
Témoins (non contenus)	96,0 ± 12,9	92,9 ± 12,9	51,8 ± 7,6	66,5 ± 7,6	37,7 ± 6,2	44,9 ± 6,2	47,1 ± 5,7	39,5 ± 5,7
Témoins (contendus)	98,4 ± 12,5	76,8 ± 12,5	61,2 ± 6,6	43,4 ± 6,6	49,0 ± 4,9	33,7 ± 4,9	46,9 ± 4,3	23,7 ± 4,3
Nombre total de branches visitées								
Témoins (non contenus)	13,4 ± 1,2	13,9 ± 1,2	11,3 ± 0,8	12,5 ± 0,8	9,7 ± 0,9	10,8 ± 0,9	9,4 ± 0,6	10,0 ± 0,6
Témoins (contendus)	11,9 ± 1,0	12,3 ± 1,0	11,5 ± 0,8	10,3 ± 0,8	10,1 ± 0,7	9,9 ± 0,7	9,1 ± 0,4	8,3 ± 0,4
Nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur								
Témoins (non contenus)	5,2 ± 0,5	4,6 ± 0,5	5,9 ± 0,5	5,4 ± 0,5	6,8 ± 0,4	7,3 ± 0,4	6,8 ± 0,3	6,7 ± 0,3
Témoins (contendus)	4,5 ± 0,5	5,3 ± 0,5	5,4 ± 0,5	5,1 ± 0,5	6,3 ± 0,5	6,2 ± 0,5	7,3 ± 0,4	7,6 ± 0,4
Nombre de branches visitées / min								
Témoins (non contenus)	9,3 ± 0,7	9,3 ± 0,7	14,2 ± 1,1	12,2 ± 1,1	16,8 ± 1,2	17,0 ± 1,2	14,6 ± 1,3	16,0 ± 1,3
Témoins (contendus)	8,6 ± 0,8	10,0 ± 0,8	13,1 ± 1,2	15,2 ± 1,2	13,8 ± 1,2	18,4 ± 1,2	13,9 ± 1,4	21,6 ± 1,4

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± E.S.M.

	Contention		Sexe		Jour de test		Contention × Sexe		Contention × Jour		Sexe × Jour		Contention × Sexe × Jour	
	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p	F _[1,47]	p
Temps total (s)	0,8	n.s.	0,8	n.s.	17,7	<0,01	6,8	<0,05	0,7	n.s.	1,4	n.s.	0,8	n.s.
Nombre total de branches visitées	1,6	n.s.	0,5	n.s.	8,6	<0,01	1,1	n.s.	1,4	n.s.	0,8	n.s.	0,7	n.s.
Nombre de branches visitées avant la 1 ^{ère} erreur	0,5	n.s.	0,0	n.s.	11,1	<0,01	0,1	n.s.	1,1	n.s.	0,7	n.s.	1,6	n.s.
Nombre de branches visitées / min	0,6	n.s.	2,8	n.s.	23,1	<0,01	8,8	<0,01	1,3	n.s.	4,3	<0,01	1,8	p=0,07

Les effets principaux et l'interaction étudiés par l'ANOVA à 2 facteurs sont présentés avec les valeurs de F obtenues et la probabilité correspondante.

n.s. : non significatif

(Tableau 63).

En termes d'interactions, les femelles élevées par des mères placées en contention au cours de la période d'allaitement ont été plus rapides à visiter les 8 branches du labyrinthe et ont visité plus de branches par minute que les femelles libres de se mouvoir, contrairement aux mâles, où des résultats inverses ont été observés (Tableau 63). De plus, une interaction entre le sexe et le jour de test a été observée sur le nombre de branches visitées par minute, montrant que les femelles ont au cours de 10 jours de test amélioré leurs performances plus rapidement que les mâles (Tableau 63). Enfin, une interaction de ces trois facteurs a été détectée concernant le nombre de branches visitées par minutes, suggérant à la fois que les femelles élevées par des mères placées en contention ont été plus performantes que les femelles libres de se mouvoir et que l'ensemble des femelles a montré une progression plus importante que celle des mâles au cours des 10 jours de test (Tableau 63).

III.2.5. Conclusion

III.2.5.1. Effets de l'exposition au fluorène

a. Sur le développement neuromoteur et sensoriel

Les résultats des tests réalisés de la naissance au 25^{ème} jour de vie postnatale ont montré des différences dans la maturation des fonctions sensori-motrices entre les animaux allaités par des mères exposées au fluorène et les jeunes nourris par les mères témoins. En particulier, les jeunes exposés à 1,5 ppb de fluorène ont montré de meilleures performances au test d'agrippement à PN4 et au test du *cliff avoidance* à PN5. Par contre, les animaux exposés à 150 ppb de fluorène ont mis plus de temps à se retourner à PN4 et ont été moins nombreux à réussir le test de retournement à PN5.

A partir de PN8, l'ensemble des animaux exposés au fluorène via leur mère durant la période postnatale a été moins performant que les jeunes témoins, en particulier dans le test de la réaction anti-gravitaire. Entre PN19 et PN21, les performances des animaux dans le test de la coordination locomotrice sont identiques entre les différents groupes, suggérant une bonne maturation des fonctions neuromotrices malgré les modifications détectées plus précocement.

Par ailleurs, un faible retard de maturation a été observé dans les deux groupes d'animaux exposés au fluorène concernant la mise en place des fonctions auditives et uniquement chez les jeunes exposés à 150 ppb de fluorène concernant la date d'ouverture des yeux.

L'étude du comportement maternel a montré au cours des 3 jours de test du ramassage des jeunes, que les femelles exposées au fluorène ont regroupé leurs jeunes plus rapidement et ont été plus actives quant à la reconstruction de nids comparé aux femelles témoins.

Les résultats obtenus au test de l'OF à PN25 ont par ailleurs montré une augmentation du niveau d'anxiété chez les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène en période postnatale comparé aux témoins.

Les résultats obtenus ont ainsi permis de mettre en évidence que les jeunes exposés à 1,5 ppb de fluorène en période postnatale ont été plus performants au cours des 1^{ers} jours de test, puis inversement jusqu'au 25^{ème} jour d'âge postnatal, contrairement aux rats exposés à la plus forte concentration de fluorène qui ont tout au long de la période de test été moins performants que les jeunes témoins.

b. Sur le comportement observé à l'âge adulte

Les résultats aux tests réalisés à l'âge adulte ont montré un effet persistant de l'exposition postnatale au fluorène sur l'activité comportementale des animaux.

En particulier dans le LCS, les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène ont montré une augmentation sensible du niveau d'anxiété comparé aux témoins. Les rats exposés à 150 ppb ont, en revanche, été significativement moins anxieux et plus actifs que les animaux témoins, montrant ainsi que les effets induits par l'exposition au fluorène dépendent de la concentration testée. De plus, l'interaction des facteurs liés à l'exposition au polluant et au sexe a montré qu'à 1,5 ppb de fluorène, les mâles exposés en période postnatale ont été moins anxieux que les femelles du même groupe et que les rats témoins. De même, les femelles exposées au cours de l'allaitement à 150 ppb ont été moins anxieuses que les mâles du même groupe dans ce test.

Comme dans le LCS, les résultats du test de l'OF réalisé à 60 jours ont montré que l'exposition postnatale à 150 ppb de fluorène a induit une diminution de l'anxiété et une augmentation du niveau d'activité. En revanche, aucun effet de l'exposition à 1,5 ppb n'a été mis en évidence dans ce test.

Le test de la BCO a révélé un effet de l'exposition à 150 ppb de fluorène qui tend à être significatif, montrant qu'à ce niveau de contamination, une diminution de l'anxiété a été observée chez les animaux adultes comparé aux rats témoins et à ceux exposés à 1,5 ppb de fluorène.

Dans le LY, une variation du niveau d'activité a également été mise en évidence, montrant que les animaux exposés via leur mère au cours de la lactation à 1,5 ppb de fluorène ont été, au début du test, plus actifs que les témoins. L'interaction de l'exposition au polluant et du sexe a également montré que les femelles exposées à 150 ppb de fluorène ont été moins actives que les femelles témoins et celles exposées à 1,5 ppb de fluorène, contrairement à l'observation faite chez les mâles où les rats exposés à forte concentration ont montré une augmentation de l'activité comparé à ceux des deux autres groupes.

L'analyse des données relevées dans le labyrinthe radial à 8 branches n'a par ailleurs montré aucun effet du facteur lié à l'exposition au fluorène sur l'activité comportementale des animaux. En revanche, un effet du sexe, ainsi qu'une interaction entre le sexe et le jour de test ont été observés, indiquant que

les femelles ont été plus rapides que les mâles au cours des 10 jours de test. De plus, un effet de l'interaction des facteurs correspondants au groupe et au sexe a été sur l'ensemble des variables testées, montrant que les mâles exposés à 150 ppb au cours de la lactation ont été plus rapides que les femelles du même groupe et que les mâles témoins. Par ailleurs, un effet du facteur lié au jour de test sur l'ensemble des variables relevées a montré une amélioration significative des performances de tous les animaux testés au cours des 10 jours. Enfin, l'absence d'effet d'interaction des trois facteurs testés révèle que l'exposition au fluorène n'a pas influencé l'apprentissage des mâles et des femelles. Toutefois, les effets des facteurs seuls et leurs interactions montrent que les stratégies de mémorisation mis en œuvre diffèrent selon le niveau d'exposition et le sexe des animaux testés.

Deux registres comportementaux ont ainsi principalement été affectés par l'exposition au polluant en période postnatale, l'anxiété et le niveau d'activité. Alors que les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène au cours de la lactation ont montré de faibles augmentations des niveaux d'anxiété et d'activité, les rats exposés à 150 ppb de fluorène au cours de la même période ont manifesté de manière significative une diminution de l'anxiété et une augmentation du niveau d'activité. Ces résultats, qui ont été obtenus dans plusieurs des cinq tests réalisés, montrent de plus la stabilité des perturbations observées.

Des atteintes comportementales à l'âge adulte ont ainsi été observées dans les deux groupes d'animaux exposés au fluorène en période postnatale. Néanmoins, des variations plus importantes ont été montrées chez les animaux exposés à la plus forte des deux concentrations testées.

III.2.5.2. Effets de l'exposition postnatale à la contention

a. Sur le développement neuromoteur et sensoriel

La comparaison des performances des animaux des deux groupes témoins a permis de révéler un effet de la contention des mères allaitantes sur le développement des aptitudes motrices et sensorielles des jeunes rats. Les résultats obtenus dans différents tests ont ainsi globalement montré que les animaux élevés par des mères contendues en période postnatale ont été plus performants que les jeunes témoins, en particulier dans les tests les plus précoces (test de retournement, test d'agrippement, réaction anti-gravitaire) (**Tableau 56**). Par contre, aucune différence concernant le temps total d'exécution du test de coordination locomotrice n'a été observée, suggérant que la maturation des deux groupes d'animaux a été similaire (**Tableau 56**). Une maturation précoce des fonctions auditive et visuelle a également été mise en évidence chez ces animaux comparés aux témoins (**Figures 38 et 39**).

L'analyse du comportement maternel a de plus montré que les mères exposées au stress de contention au cours de la lactation se sont moins occupées de leurs jeunes que les femelles libres de se mouvoir au cours des dix premiers jours de vie (**Figure 41 ; Tableau 58**).

Les résultats obtenus à l'issue du passage des animaux de 25 jours d'âge postnatal dans l'OF ont montré chez les jeunes élevés par des mères placées en contention un niveau d'activité plus élevé et une baisse de l'anxiété comparés aux animaux témoins (**Tableau 57**).

Ainsi, le stress de contention imposé aux mères au cours de la période d'allaitement a induit chez les jeunes un développement plus précoce des fonctions sensori-motrices, potentiellement en réaction au stress lié à la contention subi par la mère.

b. Sur le comportement observé à l'âge adulte

Le stress imposé aux mères au cours de la lactation a montré des effets sur l'activité comportementale des jeunes testés à l'âge adulte.

De faibles modifications des niveaux d'activité et d'anxiété ont ainsi été observées dans le LCS, montrant que les animaux élevés par des mères exposées à la contention au cours de l'allaitement ont été plus anxieux et moins actifs que les rats libres de se mouvoir. Un effet de l'interaction des facteurs liés au stress de contention des mères et au sexe des animaux testés a également été observé dans ce test ainsi que dans le labyrinthe radial à 8 branches, indiquant, à l'inverse de l'effet précédemment décrit, que les femelles élevées par des mères stressées ont été moins anxieuses et plus actives que les mâles du même groupe et que les femelles témoins.

IV. Discussion

IV.1. Effets du fluorène

Dans les deux études, des perturbations transitoires et réversibles du développement sensori-moteur ont été observées. L'exposition de femelles gestantes ou allaitantes au fluorène a induit chez les jeunes des variations ponctuelles dans la maturation des systèmes moteur et sensoriel, montrant certains jours un développement précoce et d'autres jours un retard de maturation. L'analyse du comportement maternel a par ailleurs montré que les femelles exposées au fluorène durant la lactation ont été plus attentives à leurs jeunes au cours des 1^{ers} jours de vie, montrant que le polluant a induit des effets sur les mères exposées.

A partir du 25^{ème} jour de vie postnatale, les animaux exposés au fluorène au cours de gestation ou de la lactation ont montré des modifications comportementales, affectant le niveau d'anxiété et l'activité locomotrice, ce qui, à ce stade, a amorcé les effets observés à plus long terme.

A l'âge adulte, les animaux exposés à la contamination au cours des stades précoces ont montré une baisse du niveau d'anxiété et une augmentation du niveau d'activité, plus marquées à 1,5 ppb chez les animaux exposés au fluorène *in utero* et à 150 ppb chez les animaux exposés durant la lactation. Une interaction entre l'exposition périnatale au polluant et le sexe a également été observée au plan comportemental, indiquant principalement une atténuation des différences habituellement liées au sexe.

De manière générale, l'exposition périnatale au fluorène n'a induit aucune conséquence délétère majeure sur le développement des aptitudes motrices et sensorielles précoces, mais des effets retardés sur le comportement à l'âge adulte, dépendants du niveau de contamination et de la période d'exposition.

IV.2. Effets de la contention

La mise en contention des mères au cours de la gestation ou de l'allaitement a induit des perturbations dans la maturation des fonctions sensori-motrices et des conséquences à plus long terme sur le comportement à l'âge adulte.

L'exposition au stress de contention a induit chez les jeunes exposés *in utero* un retard de maturation de l'ensemble des fonctions motrices et sensorielles se mettant en place de la naissance au sevrage et chez les ratons exposés durant la lactation un développement précoce de ces aptitudes. A 25

jours de vie postnatale, une augmentation du niveau d'anxiété et une baisse du niveau d'activité ont été observées chez les animaux exposé à la contention lors de la gestation et inversement chez les animaux nés de mères contendues au cours de la lactation. A l'âge adulte, l'ensemble des animaux nés de femelles contendues durant la période périnatale a montré une baisse globale du niveau d'activité.

**DISCUSSION,
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

I. Discussion générale

I.1. Originalité du modèle d'étude

Les études qui ont été réalisées avaient pour but d'évaluer la toxicité comportementale du fluorène, un des composés les plus volatils de la famille des HAP, suite à l'exposition répétée à une atmosphère contaminée en utilisant un modèle d'exposition par voie oro-nasale. De fait, elles s'inscrivent parmi les 1^{ères} expérimentations visant à évaluer la neurotoxicité de l'inhalation de composés de type HAP sur le développement comportemental.

Le protocole expérimental de ces études est original à plusieurs niveaux :

- *modèle d'exposition des animaux* : inhalation du polluant par voie oro-nasale,
- *choix du fluorène* : composé représentatif de la pollution liée aux HAP atmosphériques,
- *niveaux de contamination testés* : concentrations calculées dans le but de modéliser chez l'animal des cas d'expositions réalistes observés chez l'homme,
- *génération et contrôle des atmosphères* : la génération de fluorène dans les chambres d'inhalation (en particulier de 1,5 ppb) a spécifiquement été mise au point à l'INRS, et le suivi des atmosphères a permis de s'assurer des niveaux de contamination conformes aux concentrations prédéfinies,
- *quantification de fluorène et de ses métabolites au niveau cérébral* : une méthode analytique a spécialement été développée pour déterminer l'exposition des rongeurs au fluorène,
- *évaluation de la neurotoxicité comportementale* : l'expression du comportement pouvant être reliée à des structures ou des réseaux spécifiques au niveau cérébral, cette analyse non invasive permet d'appréhender des perturbations au niveau d'intégration le plus élevé.

Parallèlement aux conséquences de l'exposition au fluorène, les effets de la contention imposée par le dispositif ont été évalués pour distinguer les effets du contexte stressant de ceux du polluant comme le recommande la directive de l'OCDE pour les essais de produits chimiques par inhalation (OCDE 2009).

1.2. Effets de l'exposition au fluorène

1.2.1. Quantification de fluorène et de ses métabolites au niveau cérébral

Les études d'administration du polluant par voie *i.p.* et orale ont révélé chez les animaux exposés à 100 mg/kg/j des concentrations cérébrales de fluorène significativement plus importantes que chez les témoins, montrant que la molécule est capable de traverser la BHE. De plus, les concentrations plus élevées en métabolites observées chez les animaux exposés au fluorène dans les trois études réalisées chez l'adulte suggèrent que le polluant peut être métabolisé au niveau cérébral.

Par ailleurs, dans plusieurs études réalisées chez l'homme et l'animal, le 2-OH fluorène a été analysé comme marqueur de l'exposition au polluant (Amorim *et al.* 2009, Xia *et al.* 2009, Grova *et al.* 2006). Dans les études d'administration du fluorène par voie *i.p.* et orale, des concentrations systématiquement plus élevées de 2-OH fluorène ont été mesurées chez les animaux traités par voie orale, montrant l'importance du métabolisme périphérique dans la présence de ce métabolite au niveau cérébral (Grova *et al.* 2008, Shimada 2006).

Ces deux études préliminaires avaient pour but de cerner les effets potentiellement neurotoxiques du fluorène après une administration sans effet de 1^{er} passage (voie *i.p.*) et après une première métabolisation du composé (voie orale). Dans les deux cas, la molécule doit passer plusieurs barrières membranaires avant d'atteindre le cerveau, ce moment étant dépendant de la quantité et de la vitesse de passage du composé à travers les membranes.

De fait, des concentrations plus importantes de la molécule devaient être observées au niveau du cerveau des animaux traités par voie *i.p.* comparé à ceux traités par voie orale. Un tel résultat n'a été observé que chez les animaux traités à la plus forte dose testée (100 mg/kg/j), indiquant potentiellement une métabolisation accrue du polluant à ce niveau de contamination.

Dans les trois études d'exposition des animaux adultes au fluorène, des niveaux détectables de la molécule mère ont été analysés au niveau du cerveau des animaux témoins. Le contrôle des atmosphères dans l'étude d'exposition par inhalation ayant confirmé l'absence du polluant dans l'air des chambres témoins, ces résultats suggèrent l'existence d'un autre vecteur de contamination des animaux au fluorène. Des analyses complémentaires ont permis d'identifier la source de la contamination comme relevant d'une intoxication préalable des animaux chez le fournisseur (Grova *et al.* 2011).

Par ailleurs, des concentrations significativement plus faibles de fluorène ont été mesurées au niveau du cerveau des animaux exposés au polluant par inhalation comparé aux témoins. Ce résultat est peut-être relatif à la particularité de la voie nasale qui permet aux molécules inhalées d'avoir un accès direct au cerveau. De fait, une rapide métabolisation du fluorène a pu avoir lieu au niveau cérébral, conduisant à la transformation de la molécule mère en métabolites. Cette hypothèse est renforcée par des concentrations significativement plus élevées de 9- et de 2-OH fluorène mesurés chez les animaux exposés à 150 ppb comparé aux témoins (**Tableau 64**).

1.2.2. Sur le développement neurocomportemental

1.2.2.1. Reproduction

Dans la mesure du possible, une standardisation des portées a été réalisée dans les études d'exposition périnatale au fluorène, cette pratique étant autorisée, voire recommandée, par la directive 426 de l'OCDE concernant l'étude de neurotoxicité pour le développement de produits chimiques (OCDE 2007). En particulier, la standardisation des portées à la naissance permet de réduire l'effet du à la taille de la portée sur la croissance des jeunes, là où une corrélation inverse a été mise en évidence entre ces deux paramètres (Chahoud et Paumgartten 2009, OCDE 2007, Agnish et Keller 1997). De même, une maturation plus lente dans le développement sensori-moteur des animaux a été observée chez des jeunes issus de grandes portées, celle-ci étant entre autres induite par des modifications du comportement maternel (Chahoud et Paumgartten 2009, Deviterne *et al.* 1990, Agnish et Keller 1997). De plus, elle contribue à un meilleur traitement statistique des données, les effectifs au sein des groupes étant constants, et à une détection plus sensible des effets de la contamination étudiée (Agnish et Keller 1997). Ainsi, si des effectifs suffisamment importants ont été obtenus dans la 2^{ème} étude pour permettre cette pratique, dans la 1^{ère} étude, des portées trop faibles en nombre de rats n'ont permis aucune standardisation. Certaines portées n'ont de plus pas été incluses dans cette étude du fait d'un nombre insuffisant de jeunes. Du fait que la prise de poids des animaux issus de petites portées est plus rapide que celle de jeunes nés dans de plus grandes portées et que la maturation des fonctions sensori-motrices est liée à la croissance des jeunes, l'analyse concomitante de la croissance pondérale et du développement sensori-moteur de ces animaux est susceptible de conduire à des résultats discordants (Deviterne *et al.* 1990, Gelly 1979).

Tableau 64 : Résumé des effets comportementaux et physiologiques induits après administration répétée de fluorène par voie *i.p.*, orale ou inhalatoire

		voie i.p.			voie orale			voie inhalatoire	
		1 mg/kg/j	10 mg/kg/j	100 mg/kg/j	1 mg/kg/j	10 mg/kg/j	100 mg/kg/j	1,5 ppb	150 ppb
Analyse comportementale									
LCS	<i>anxiété</i>	↘↘	↘	-	↘↘	-	-	↗	↗
	<i>activité</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
OF	<i>anxiété</i>	-	-	-	-	-	-	↘↘	↘
	<i>activité</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
LY	<i>MCT</i>							-	-
	<i>activité</i>							-	-
Labyrinthe radial à 8 branches	<i>MCT</i>	-	-	-	-	↘ ^T	↘ ^T	-	-
	<i>MLT</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>activité</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
TESLA	<i>MCT</i>	-	-	-	-	-	-		
	<i>MLT</i>	-	-	-	-	-	-		
	<i>activité</i>	-	↗	-	↗ ^T	-	-		
Mesures physiologiques									
	<i>Poids corporel</i>	-	-	↘	-	-	↘	-	-
	<i>Poids relatif du cerveau</i>	-	-	-	-	↗ ^T	↗ ^T	-	-
	<i>Poids relatif du foie</i>	-	-	↗↗	↗	↗↗	↗↗	-	-
Concentrations cérébrales									
	<i>fluorène</i>	-	-	↗↗	-	-	↗↗	-	↘↘
	<i>9-OH fluorène</i>	-	-	↗↗	-	-	↗↗	-	↗↗
	<i>3-OH fluorène</i>	n.d.	↗↗	↗↗	-	-	↗↗	n.d.	n.d.
	<i>2-OH fluorène</i>	-	-	↗↗	-	-	↗↗	-	↗↗

test non réalisé

^T tendance statistique

n.d. : non détecté

1.2.2.2. Effets sur le développement sensori-moteur et le comportement à l'âge adulte

Dans les deux études d'exposition périnatale au fluorène, des perturbations ponctuelles du développement sensori-moteur ont été observées.

D'une part, l'exposition de femelles gestantes au fluorène a induit chez les jeunes des variations transitoires, montrant certains jours une maturation précoce et d'autres jours un retard dans le développement de réflexes moteurs et d'aptitudes sensorielles. Par rapport aux deux concentrations étudiées, un plus grand nombre de différences a été mis en évidence chez les jeunes exposés à la faible concentration montrant un effet de l'exposition prénatale au fluorène potentiellement plus délétère à ce niveau de contamination. Pour autant, l'exposition prénatale au fluorène n'a induit aucune perturbation majeure dans la mise en place des fonctions précoces chez l'animal, les modifications observées étant transitoires au cours des trois 1^{ères} semaines de vie postnatale. A PN25, les animaux exposés ont montré un niveau d'activité plus élevé, amorçant à ce stade les effets observés à l'âge adulte. A partir de PN60, des modifications concernant les trois registres comportementaux étudiés ont été observées chez ces animaux, incluant une baisse du niveau d'anxiété et une augmentation du niveau d'activité. Par rapport aux concentrations, une diminution significativement plus importante du niveau d'anxiété a été mise en évidence chez les rats exposés à 1,5 ppb comparé à ceux exposés à 150 ppb de fluorène. Une modification sensible des performances mnésiques a également été observée, indiquant chez les mâles exposés *in utero* à 1,5 ppb de fluorène une amélioration des capacités d'apprentissage à court terme. Enfin, l'analyse de l'interaction des deux facteurs étudiés à l'âge adulte (« Groupe » et « Sexe ») montre que l'exposition au fluorène a induit des effets distincts suivant le sexe, affectant le niveau d'anxiété et l'activité locomotrice des animaux. Alors que les femelles sont habituellement plus actives et moins anxieuses que les mâles, dans la plupart des tests, aucune différence n'a été montrée entre les deux sexes suite à l'exposition au fluorène.

L'étude des effets de l'exposition au fluorène au cours de la lactation a montré que les jeunes exposés à 1,5 ppb de fluorène ont eu un développement plus précoce au cours des 1^{ers} jours de vie postnatale, avant de devenir moins performants jusqu'au sevrage, tandis que les animaux exposés à 150 ppb de fluorène ont exprimé tout au long de cette période des retards sensibles dans la maturation des fonctions motrices et sensorielles. De plus, l'analyse du comportement maternel a montré que les mères exposées au polluant au cours de la lactation ont été plus actives et plus attentives à leurs jeunes. Compte tenu des modifications comportementales observées chez l'animal adulte exposé aux mêmes concentrations de fluorène (**Chapitre 2 : IV.2.**) et des modifications mises en évidence dans cette étude, les effets directs de l'exposition sur le comportement de la mère doivent être considérés. Comme cela a

été montré dans des travaux antérieurs, aux effets du transfert mère-jeune de la contamination s'ajoutent ceux de l'exposition au polluant sur le comportement de la mère (Cummings *et al.* 2010). Par ailleurs, les résultats obtenus dans l'OF réalisé à PN25 et dans le LCS à PN60 ont montré une augmentation du niveau d'anxiété chez les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène en période postnatale. Au contraire, les animaux exposés à 150 ppb de fluorène ont à l'âge adulte montré une baisse du niveau d'anxiété et un niveau d'activité plus élevé que les témoins.

L'ensemble des études réalisées a ainsi montré une modification du niveau d'anxiété et de faibles perturbations de l'activité locomotrice et des capacités d'apprentissage à court terme chez l'animal adulte exposé directement ou indirectement au fluorène.

En particulier, des résultats analogues ont été observés suite à l'exposition au fluorène au cours de la vie fœtale ou postnatale dans plusieurs tests à l'âge adulte, témoignant de la robustesse des effets induits. Les perturbations mises en évidence suggèrent une neurotoxicité retardée plus marquée à 1,5 ppb chez les animaux exposés *in utero* et à 150 ppb chez ceux exposés au cours de la lactation.

Ces résultats montrent ainsi que les effets induits par l'exposition au polluant dépendent du niveau de contamination, de la voie d'entrée du composé et du moment d'exposition.

1.2.2.3. Lien entre effets précoces et effets à l'âge adulte

L'exposition directe étudiée chez l'adulte diffère de l'exposition indirecte chez le jeune du fait du transfert de la contamination par l'organisme maternel. Lorsque la mère est le vecteur de l'intoxication, le composé est métabolisé par l'organisme maternel avant d'atteindre le jeune par transfert placentaire ou lactationnel. A priori, l'individu au cours de ses stades précoces de développement est considéré comme un organisme plus vulnérable qu'à l'âge adulte du fait de l'immaturation de ses systèmes de protection enzymatique et de ses capacités de métabolisation réduites. De plus, le développement implique une série de choix organisationnels irréversibles une fois ceux-ci déterminés. La plupart des études sur les effets de l'exposition périnatale à des composés chimiques ont montré des perturbations précoces, telles que des atteintes de la reproduction, de l'activité comportementale et du système immunitaire et aucune atteinte à l'âge adulte (Crews *et al.* 2000, Howdeshell *et al.* 1999, Palanza *et al.* 1999).

A l'inverse, l'exposition périnatale au fluorène a montré des perturbations transitoires aux cours des stades précoces de développement sur la maturation des systèmes moteurs et sensoriels et des troubles des fonctions cognitive et émotionnelle à l'âge adulte. Contrairement au cerveau adulte, le cerveau en développement possède une grande plasticité. Les effets retardés de l'exposition au fluorène

suggèrent d'une part l'existence de mécanismes compensatoires précoces, protégeant l'organisme en développement des expositions environnementales toxiques, et d'autre part une spécificité des effets liée aux transferts placentaire et lactationnel de la molécule (Barton 2005). Pour de nombreux composés, l'imprégnation est plus importante durant la vie fœtale que durant l'allaitement, du fait d'un passage plus facile de la barrière placentaire. Une étude épidémiologique récente a suggéré que la pollution atmosphérique serait capable de perturber les fonctions endothéliales ou cardiovasculaires de la femme enceinte, ce qui pourrait limiter les échanges entre la mère et le fœtus, et donc altérer la croissance du jeune (Slama *et al.* 2009). Durant la lactation, la quantité et le taux de transfert des composés du sang vers le lait maternel dépendent de nombreux facteurs comme leur solubilité dans les lipides, leur masse molaire et leur fixation (ou non) sur des protéines plasmatiques. Cependant, les mécanismes précis de ce transfert, aussi bien des composés toxiques que des éléments essentiels, sont encore peu connus (Oskarsson *et al.* 1998).

L'hypothèse d'une programmation précoce des effets neurotoxiques, c'est-à-dire d'une influence de l'environnement du fœtus et du nouveau né sur l'accroissement des risques sanitaires à long terme et l'avènement de maladies neurodégénératives, est émise depuis une dizaine d'année (Osmond et Barker 2000). Chez l'homme, ces atteintes neurotoxiques (déficits attentionnels, perte de points de QI), sont qualifiées d'intoxication « à bas bruit » ignorées par la médecine officielle, et ne sont mises en évidence que par des batteries de tests employées lors d'études épidémiologiques d'exposition. Ces effets ne sont cependant pas sans conséquences sur le devenir des enfants, subissant les effets de substances neurotoxiques (PCB, métaux, solvants) (Grandjean et Landrigan 2006). L'influence des facteurs environnementaux sur la détermination précoce des perturbations observées à l'âge adulte conduit ainsi à considérer non plus la dose, mais le moment d'exposition dans la toxicité observée.

1.2.3. Effets de l'exposition à faibles doses

Dans les trois études menées chez l'animal adulte, des quantités négligeables de fluorène et de trois de ses métabolites ont été mesurées au niveau cérébral (représentant moins de 0,001% de la quantité administrée ou inhalée). Pour autant, des modifications comportementales ont été mises en évidence, indiquant que celles-ci ont suffi à induire une toxicité.

En particulier, des concentrations cérébrales significativement plus importantes de fluorène et de ses trois métabolites ont été mesurés chez les animaux traités à la plus forte dose par voie *i.p.* ou orale (100 mg/kg/j), alors que seules des atteintes comportementales aux deux plus faibles doses testées (1 et 10 mg/kg/j) ont été révélées (**Tableau 64**). De même, les animaux exposés par inhalation à la plus faible concentration de fluorène (1,5 ppb) ont montré des concentrations cérébrales en métabolites plus

faibles et de plus importantes modifications comportementales comparés aux animaux exposés à la plus forte concentration (150 ppb) (**Tableau 64**).

Ces résultats laissent ainsi supposer que les faibles doses testées dans ces trois études présentent une plus grande toxicité que les fortes doses. De plus, les concentrations testées dans les études d'exposition par inhalation ont révélé des atteintes comportementales à des niveaux de contamination environnementale, montrant ainsi les risques de l'exposition à l'air ambiant.

Depuis les années 2000, de nombreux travaux ont porté sur l'évaluation des effets d'expositions chroniques à de faibles doses ou de faibles concentrations de composés chimiques. Des effets à faibles doses différents de ceux induits à fortes doses (niveaux de contamination utilisés dans des processus d'évaluation du risque) ont été observés suite à l'exposition à des composés considérés comme perturbateurs endocriniens (pesticides, BPA, PCB), capables de se lier à des récepteurs œstrogéniques et d'interférer avec le développement cellulaire normal de certains tissus (Palanza 2008, 1999). Un effet dose-réponse, se caractérisant par une stimulation à faible dose et une inhibition à plus forte dose, résultant ainsi en une courbe dose-réponse non monotone, est devenu plus fréquent que les effets seuil ou linéaire (vom Saal *et al.* 1997). Des processus de réparation, d'adaptation et de maintenance, améliorant les capacités fonctionnelles, sont alors potentiellement activés à faibles doses, suivant une rupture de l'état initial d'homéostasie, dans le but de prévenir et de limiter les effets toxiques de l'exposition à une dose plus élevée (Rattan 2004).

Plusieurs travaux évaluant les effets de composés de type HAP (benzo(b)fluoranthène, B(a)P) ont montré que l'exposition périnatale et à l'âge adulte à de faibles niveaux de contamination était susceptible d'induire des effets plus délétères qu'à de plus fortes doses chez le rongeur, tels que des atteintes de la fonction de reproduction (Kim *et al.* 2011) et une augmentation de l'agressivité chez les mâles (Bouayed *et al.* 2009b), ainsi que des perturbations des capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiale à court terme chez les femelles exposées *in utero* (Bouayed *et al.* 2009a). Une étude complémentaire a permis de faire l'hypothèse de l'augmentation de l'expression génique de récepteurs à la sérotonine (5HT1A) et à la noradrénaline (alpha-1D adrenergic: ADRA1D), exprimés chez les femelles exposées à la faible dose (0,02 mg/kg) et non aux fortes doses testées (0,2 et 20 mg/kg), dans l'induction des effets observés (résultats non publiés). Bouayed *et al.* (2009a) ont également montré que l'exposition au B(a)P au cours de la lactation impactait le système sérotoninergique en diminuant l'expression du gène 5HT1A chez les jeunes exposés au polluant aux deux plus fortes doses. Néanmoins, les effets de ces composés sur les voies de signalisation du SNC sont complexes et très peu définis.

1.2.4. Mécanismes d'action

1.2.4.1. Effets liés à la voie d'entrée de la contamination

Les études préliminaires, ayant montré la présence de fluorène dans le cerveau à des concentrations significativement élevées, ont prouvé que la molécule mère était capable de traverser la BHE. Malgré une plus faible perméabilité des cellules endothéliales de la BHE aux substances chimiques par rapport à d'autres parois capillaires, les substances liposolubles, telles que les HAP, sont capables de les traverser plus rapidement comparé à des composés faiblement liposolubles, les membranes cellulaires étant de nature lipoïdique.

L'exposition par inhalation d'un composé implique son passage par les voies respiratoires et olfactives, ainsi que par la voie orale. Une molécule inhalée est ainsi susceptible d'être métabolisée au niveau de l'épithélium pulmonaire, de la cavité nasale, de l'intestin et du foie.

En particulier, des molécules organiques, des solvants, des métaux, certaines drogues et virus sont susceptibles d'accéder directement au cerveau par la muqueuse olfactive, les neurones olfactifs primaires de la cavité nasale étant les seuls neurones sensitifs qui présentent à la fois un contact avec le milieu extérieur et des afférences dans le SNC (Dorman *et al.* 2002, Persson *et al.* 2002, Larsson et Tjälve 2000, Lin *et al.* 1999, Quadir *et al.* 1999, Tjälve et Henriksson 1999, Evans et Hastings 1992, Holl 1980). Les composés exogènes sont ainsi capables d'atteindre le bulbe olfactif, ainsi que d'autres régions cérébrales sans transiter à travers la BHE. Par cette voie d'entrée, ils accèdent directement au cerveau et peuvent induire des effets plus rapidement que par voie orale. La diffusion rapide des composés à travers l'épithélium nasal conduit à une intégration facilitée dans le réseau vasculaire ou nerveux sous-jacent. Des études portant sur l'instillation de B(a)P radiomarqué dans la muqueuse nasale ont montré que la molécule mère et certains métabolites étaient transportés le long des axones des neurones olfactifs jusqu'au bulbe olfactif (Persson *et al.* 2002). Chez plusieurs espèces, l'épithélium nasal contient des enzymes de métabolisation (cytochromes P450) à des niveaux plus importants que ceux présents dans la région respiratoire (Thornton-Manning et Dahl 1997). Bien qu'au niveau du bulbe olfactif, ces enzymes ne montrent aucune activité spécifique (Morse *et al.* 1998), l'exposition répétée au B(a)P est susceptible de conduire à la bioactivation et à l'induction de tumeurs à des niveaux d'activité enzymatique très bas (Persson *et al.* 2002). Des études réalisées chez le chien ont également montré que l'exposition à des mélanges complexes de polluants atmosphériques était susceptible d'induire des altérations des tissus respiratoires et olfactifs, de la BHE, ainsi que des signes d'atteintes physiopathologiques cérébrales (Calderón-Garcidueñas 2007, 2002).

1.2.4.2. Toxicité de la molécule mère ou des métabolites

Dans l'étude des effets de l'inhalation du fluorène chez l'animal adulte, des modifications comportementales ont été mises en évidence principalement chez les animaux exposés à 1,5 ppb de fluorène. L'analyse des concentrations cérébrales du polluant et de trois de ses métabolites a montré des concentrations significativement plus faibles de fluorène dans les deux groupes d'animaux exposés et une augmentation significative du 2-OH fluorène chez les rats exposés à 150 ppb (**Tableau 64**). La présence d'importantes concentrations de ce métabolite chez ces animaux peut être due à une plus faible capacité d'élimination à forte concentration, potentiellement en réponse à une saturation des processus de biotransformation de la molécule mère par les cytochromes P450 (Saunders *et al.* 2002).

Ces résultats posent la question de la molécule à l'origine de la toxicité comportementale observée (molécule mère ou métabolite) et de son mode d'action. L'étude de l'exposition au B(a)P a montré une corrélation entre les effets neurotoxiques mis en évidence et les concentrations cérébrales de certains de ses métabolites, laissant ainsi supposer que le métabolisme joue un rôle important dans la toxicité comportementale du composé (Saunders *et al.* 2002). L'induction du métabolisme conduit à la formation de métabolites et à l'augmentation ou la diminution des effets si ces derniers sont actifs ou inactifs. Des études ont montré que certains métabolites étaient plus réactifs que les composés parents, pouvant induire des effets mutagènes, carcinogènes (Uno *et al.* 2001, Denison et Whitlock 1995), ainsi que des effets semblables à ceux induits par des composés de type perturbateurs endocriniens (van de Wiele *et al.* 2005, van Lipzig *et al.* 2005, Fertuck *et al.* 2001). La réponse « non monotone » mise en évidence dans notre étude peut être relative à un changement du rapport entre les dommages cellulaires et la réparation des dommages. A faible dose, les systèmes de réparations soit ne sont pas induits, ou insuffisamment, soit sont initiés avec retard, c'est-à-dire quand l'individu exposé a déjà subi les dommages de l'exposition. L'absence de réparation pourrait ainsi expliquer les effets neurotoxiques plus marqués observés suite à l'exposition au fluorène à faible concentration.

Dans les études d'exposition périnatale au fluorène, les animaux à l'âge adulte ont montré au plan comportemental des effets qualitativement semblables à ceux observés chez les animaux adultes exposés directement au polluant. Les variations observées suivant la concentration et la période d'exposition suggèrent cependant l'implication du métabolisme maternel dans la fonctionnalisation du composé. Les perturbations observées chez les animaux adultes exposés en période périnatale laissent supposer soit que le composé est transféré au jeune au cours de la gestation et de l'allaitement, soit que celles-ci résultent de des modifications induites au niveau de l'organisme maternel. En considérant la 1^{ère} hypothèse, les effets retardés de l'exposition pourraient être dus à l'accumulation au niveau du foie au cours des stades précoces de développement et à la distribution différée du polluant au niveau du

cerveau, le développement graduel de la BHE influençant la disposition des composés chez le jeune et la neurotoxicité développementale (Dorman *et al.* 2001).

1.2.4.3. Effets des perturbateurs endocriniens

Plusieurs POP ont déjà été listés comme perturbateurs endocriniens (HAP, PBDE, PCB, pesticides, PCDD) (Perera *et al.* 2011, Weiss 2011, Palanza *et al.* 1999), lesquels sont communément trouvés à faibles doses dans de nombreux produits et dans l'environnement. En particulier, les composés de type HAP et/ou leurs métabolites peuvent interférer avec des voies de signalisation aux œstrogènes (Kummer *et al.* 2008, Abdelrahim *et al.* 2006, van Lipzig *et al.* 2005, Pearce *et al.* 2004, Tsai *et al.* 2004, Ohtake *et al.* 2003, Fertuck *et al.* 2001, Charles *et al.* 2000) et sont susceptibles d'induire une toxicité développementale et endocrinienne chez l'animal telle qu'une diminution du poids des organes reproducteurs, un déficit de croissance des follicules ovariens, une diminution de la fertilité, des atteintes embryonnaires et des perturbations de la spermatogénèse chez les mâles (Kim *et al.* 2011, Ramesh *et al.* 2008, Inyang *et al.* 2003, Borman *et al.* 2000, MacKenzie et Angevine 1981).

Au-delà des atteintes fonctionnelles de l'axe reproducteur observées suite à l'exposition périnatale à des perturbateurs endocriniens, ceux-ci peuvent également induire des modifications comportementales sexe-dépendantes (Weiss 2011, 2005). Les atteintes comportementales s'inscrivant parmi les conséquences les plus visibles des troubles pouvant être induits par une intoxication, leur évaluation présente l'avantage de révéler à la fois les effets directs et indirects de l'exposition. Dans certains cas, l'analyse du comportement constitue le seul indice de déficits fonctionnels susceptibles d'être induits à différents niveaux physiologiques, peut être plus sensible et peut donner une réponse plus rapide que certains biomarqueurs d'exposition. En particulier, l'exposition au B(a)P a montré chez les mâles une augmentation de l'agressivité et une perturbation du comportement sexuel (Bouayed *et al.* 2009b). L'observation de comportements sexuels dimorphiques, tels que le niveau d'anxiété, l'activité locomotrice et le comportement de reproduction, permet alors d'analyser les conséquences développementales délétères induites par l'exposition à ces composés (Weiss 2010, 2002, Patisaul et Polston 2008). Alors que les femelles, confrontées à un environnement nouveau, montrent en période pré- ou post-pubertaire, un niveau d'activité et d'exploration plus élevé et un niveau d'anxiété plus faible que les mâles placés dans la même situation au même âge, l'exposition à des composés chimiques (BPA, polybromés, phtalates) en période périnatale a déjà montré une diminution, voire l'annulation des différences liées au sexe (Weiss 2010, Palanza *et al.* 2008, 1999). L'exposition précoce à certains composés chimiques est susceptible d'induire des atteintes comportementales principalement chez les femelles, lesquelles montrent un niveau d'exploration davantage similaire à celui des mâles qu'à celui des femelles témoins. Cette diminution de la réactivité des femelles exposées

à de nouveaux stimuli, témoignent de l'action œstrogénique des composés testés et de la « déféminisation » ou la « masculinisation » induite par l'exposition à ces composés (Palanza *et al.* 2008, 1999). Il a également été observé que des mâles exposés à certains composés chimiques exprimaient dans certains tests des comportements similaires à ceux des femelles (Palanza *et al.* 2008, 1999). De manière générale, une réduction ou une inversion des différences liées au sexe des animaux exposés comparé aux témoins ont été observées, aussi bien avant la puberté (i.e., avant l'augmentation de la production des hormones sexuelles produites par les gonades) qu'à l'âge adulte. L'exposition aux composés chimiques à action œstrogénique diminuant les différences comportementales existant entre les deux sexes, cela peut être un indicateur de l'interaction entre les effets de l'exposition du composé testé sur le développement et l'organisation du SNC et les systèmes de récepteurs des deux sexes. L'exposition à de faibles doses au moment des processus cérébraux de différenciation sexuelle peut ainsi influencer le comportement des animaux à l'âge adulte de manière sexe-dépendante.

Dans les deux études d'exposition au fluorène en période périnatale, des effets d'interaction entre l'exposition au polluant et le sexe des animaux ont été mis en évidence dans plusieurs tests comportementaux, montrant ainsi que le polluant est susceptible d'interagir avec des mécanismes cérébraux sous-jacents au processus de différenciation sexuelle, lesquels contrôlent l'activité exploratoire et les émotions exprimées à l'âge adulte. Les résultats de ces études ont ainsi montré un effet sexe-dépendant de l'exposition au polluant, se traduisant par une atténuation des différences comportementales généralement observées entre les deux sexes (**Tableau 65**).

1.2.4.4. Effets de l'exposition à un mélange de composés

Actuellement, malgré le développement depuis 10 ans de l'étude des effets des mélanges de composés chimiques, qui reflètent plus spécifiquement la réalité de l'exposition de l'ensemble de la population, les méthodes d'évaluation toxicologiques ne sont en grande partie basées que sur les effets de l'exposition à un seul composé. Lors de l'évaluation d'un mélange, les données relatives à l'évaluation de chaque molécule seule sont extrapolées, et lorsqu'un mélange contient un grand nombre de composés, l'évaluation des risques devient de moins en moins sûre (EC 2011, 2009, US EPA 2006, 2000, Carr *et al.* 2002, Bemis et Seegal 1999, Carpenter *et al.* 1998, Yang 1998). Les principales difficultés relèvent du fait que chaque composé seul a un mode d'action, et que lorsque ces composés se retrouvent dans un mélange, ils peuvent exprimer un mode d'action identique ou différent de celui qui s'exprime lorsqu'il est considéré seul. L'analyse des effets des composés seuls n'est ainsi pas suffisante pour en déduire les effets d'un mélange de molécules et des informations suffisantes sur le mode d'action d'un nombre limité de produits chimiques sont actuellement disponibles. Six types

Tableau 65 : Résumé des effets comportementaux induits après l'inhalation répétée de fluorène par la rate gestante ou allaitante sur l'activité comportementale à l'âge adulte

		exposition de la rate gestante			exposition de la rate allaitante		
		contention	1,5 ppb	150 ppb	contention	1,5 ppb	150 ppb
LCS	<i>anxiété</i>	F < M	↘↘ F = M	↘ F = M	↗ ^T F < ^T M	↗ ^T F > M	↘ F < M
	<i>activité</i>	↘ F > M	↗ F > M	↗ F > M	↘ F > ^T M	F > M	↗ F > M
OF	<i>anxiété</i>	F = M	↘↘ F > M	F < M	F < M	F < M	↘ F < M
	<i>activité</i>	↘ ^T F > ^T M	↗ ^T F > M	F > M	F > M	F > M	↗ F > M
BCO	<i>anxiété</i>	F < M	F > M	F < M	↘ ^T F = M	F < M	↘ ^T F < M
	<i>activité</i>	F > M	F < M	F > M	F > M	F > M	F > M
LY	<i>MCT</i>	F < ^T M	F < ^T M	F > ^T M	F = M	F = M	F = M
	<i>activité</i>	↘ ^T F > M	F > M	F > M	F > M	↗ ^T F > M	F = M
Labyrinthe radial à 8 branches	<i>MCT</i>	↘ F = M	F = M	F = M	F = M	F < ^T M	F < ^T M
	<i>MLT</i>	F = M	F = M	F = M	F = M	F > ^T M	F < ^T M
	<i>activité</i>	↘↘ F > ^T M	↗ ^T F = M	↗ F = M	F > M	F > M	F < M

F = M, pas de différence significative entre les femelles et les mâles; F > M, résultats statistiquement plus importants chez les femelles comparé aux mâles; F < M, résultats statistiquement plus faibles chez les femelles comparé aux mâles; ↘, ↗ diminution ou augmentation significative du comportement après l'exposition au fluorène.

^T: tendance statistique

d'interaction entre les différents composés d'un mélange peuvent avoir lieu : un effet de synergie, de potentialisation, antagoniste, d'inhibition, de masquage ou aucune influence. L'interaction dépend également de la part de chaque composé au sein du mélange.

En particulier, la toxicité développementale de mélanges de HAP n'est pas nécessairement additive contrairement à celle d'autres POP tels que les dioxines, celle-ci étant liée à de multiples mécanismes et à leur rapide métabolisation (Billiard *et al.* 2008). Des études animales complémentaires sont nécessaires pour continuer à déterminer les effets des composés seuls et ceux de différents mélanges de HAP, leur composition étant dépendante des processus qui ont conduit à leur génération.

L'analyse des effets tous les mélanges existants et des expositions multiples est plus représentative de la réalité mais très difficile à mettre en œuvre et à interpréter du fait du nombre presque infini de combinaisons possibles. De fait, des critères de sélection sont nécessaires pour permettre de mettre l'accent sur des mélanges potentiellement préoccupants (EC 2011). La prédiction d'interactions possibles étant très spécifique, elle doit donc être considérée au cas par cas. Sur la base de ces conclusions, un arbre de décision est proposé par les Comités pour évaluer le risque de mélanges de produits chimiques.

1.3. Effets de la contention

L'ensemble des animaux placés dans les tubes d'exposition par voie nasale ayant été préalablement habitué au dispositif, ils ont au total été placés en contention 6h/j durant 20 jours pour les femelles gestantes et allaitantes et 22 jours pour les rats adultes. La taille du tube étant susceptible d'influencer les effets induits par la contention, des conséquences encore plus délétères peuvent être observées chez un animal inconfortablement placé (Narciso *et al.* 2003). En particulier, le placement de femelles gestantes dans le dispositif s'est avéré de plus en plus difficile à mesure que celles-ci prenaient du poids. Cette contrainte peut ainsi avoir contribué aux effectifs réduits observés dans l'étude d'exposition des femelles gestantes, tel que cela a déjà été rapporté (Baker *et al.* 2008).

Dans l'étude d'exposition des animaux adulte, les niveaux de CORT plasmatique, similaires entre les groupes tout au long de l'expérimentation, ont montré que les animaux s'étaient adaptés à la situation stressante (**Tableau 30**), s'inscrivant ainsi en accord avec les résultats de Narciso *et al.* (2003). Dans les trois études d'exposition par inhalation, l'évaluation des quatre groupes a montré un effet non spécifique du contexte stressant et un effet spécifique du fluorène sur le comportement des animaux.

De manière générale, la situation d'exposition a induit une perturbation de l'activité chez l'animal adulte exposé directement et indirectement à la contention.

L'interaction entre l'exposition au fluorène et le stress n'a pas été évaluée, du fait qu'au plan expérimental deux groupes d'animaux libres de se mouvoir et exposés au fluorène auraient également du être testés. Néanmoins, dans ces deux groupes placés corps entier dans les chambres d'inhalation, l'exposition par voie nasale stricte n'aurait plus été respectée. Des travaux ayant montré l'influence d'un stress cumulé à une exposition toxique, directement subie ou via l'organisme maternel, laissent supposer que les variations mise en évidence dans nos trois études sont susceptibles de résulter de l'interaction de ces deux facteurs (Virgolini *et al.* 2006, Hougaard *et al.* 2005).

Par ailleurs, les effets de la séparation maternelle sur le développement des jeunes n'ont pas été évalués dans l'étude d'exposition des femelles au cours de la lactation. Des travaux antérieurs ont néanmoins montré des effets délétères de la séparation maternelle sur le développement normal des jeunes et l'activité comportementale à l'âge adulte (Muhammad et Kolb 2011, Stiller *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011). De plus, les mères ne pouvant pas se nourrir durant le temps de l'exposition, cette « sous-alimentation » peut avoir impacté d'une part le déroulement de la gestation dans le cas de l'exposition des femelles gestantes et d'autre part induit des effets délétères sur le développement postnatal des jeunes dans le cas de l'exposition des femelles au cours de la lactation. Des études ont montré que des femelles gestantes sous-alimentées pouvaient allonger la durée de la gestation pour palier aux effets nocifs de la carence (Gelly 1979). Néanmoins, le fœtus semble assez bien protégé des effets d'une telle carence, contrairement aux jeunes qui, exposés à un tel stress en période postnatale, sont beaucoup plus vulnérables (Gelly 1979).

L'exposition au stress de contention en période périnatale a induit des effets distincts suivant le moment d'exposition. Les jeunes exposés *in utero* ont ainsi montré un retard de maturation de l'ensemble des fonctions motrices et sensorielles se mettant en place de la naissance au sevrage, alors qu'une maturation précoce de ces fonctions a été observée chez les animaux nés de mères contendues au cours de la lactation. En revanche, à l'âge adulte, une baisse du niveau d'activité a globalement été observée pour l'ensemble des animaux exposés à la contention en période périnatale. Des résultats similaires ont été observés lors d'études antérieures testant les effets d'une exposition à un stress pré- ou postnatal sur le développement sensori-moteur des jeunes (Patin *et al.* 2005, 2004, Secoli et Teixeira 1998).

L'exposition par voie nasale au polluant ne pouvant être réalisée sans le maintien des femelles dans les tubes de contention, les effets de l'inhalation de fluorène résultent probablement de l'interaction de ces deux facteurs. La combinaison de l'exposition à un stress prénatal et à un composé neurotoxique pour le développement ayant déjà montré des effets plus importants que ceux des facteurs seuls (Hougaard *et al.* 2005).

Par ailleurs, l'étude des effets de l'exposition à un stress à l'âge adulte ou en période prénatale a montré un effet sexe-dépendant sur le niveau d'anxiété (Cherian *et al.* 2010, Baker *et al.* 2008), les capacités d'apprentissage (Baker *et al.* 2008, Mueller et Bale 2007, Beck et Luine 2002, Bowman *et al.* 2002) et l'émotivité (Abe *et al.* 2007). L'exposition à un stress implique de même un dimorphisme sexuel sur le développement comportemental et cognitif chez le rongeur (Patchev et Almeida 1998, Young 1998), montrant que les femelles sont plus sensibles que les mâles (Kendler *et al.* 2000, Kendler 1998, Kornstein 1997).

L'altération des fonctions cérébrales chez l'adulte exposé à un stress prénatal résulteraient de malformations précoces de l'hippocampe (Cherian *et al.* 2009). L'effet du sexe sur le comportement semble être relatif à une réduction de la plasticité au niveau de l'hippocampe chez les mâles soumis à un stress prénatal et une augmentation de cette plasticité chez les femelles (Darnaudéry et Maccari 2008). Néanmoins, malgré l'imprégnation permanente de l'exposition précoce au stress, les perturbations observées après le stress prénatal de contention est potentiellement réversible. Les mécanismes sous-jacents aux effets du stress prénatal de contention sont à ce jour encore mal connus (Darnaudéry et Maccari 2008).

II. Conclusion générale et perspectives

Les résultats des différentes études menées sur la toxicité du fluorène pris comme molécule modèle de l'exposition atmosphérique aux HAP ont permis de montrer la capacité de cette molécule à induire des modifications comportementales autant chez l'animal adulte que chez le jeune né d'une mère exposée pendant la gestation ou la lactation.

Ainsi, l'administration quotidienne de fluorène par voie *i.p.* ou orale pendant 90 jours chez le rat adulte a induit des troubles neurocomportementaux relatifs à l'anxiété et à l'activité aux deux des trois doses administrées (1 et 10 mg/kg/j), ainsi que des atteintes physiologiques relatives au poids corporel et au poids du foie mais uniquement à la plus forte dose (100 mg/kg/j). Par ailleurs, l'analyse des concentrations cérébrales du fluorène et de trois ses métabolites a permis de montrer le passage de la molécule à travers la BHE et sa métabolisation au niveau du cerveau.

L'exposition répétée au fluorène par inhalation pendant 14 jours chez l'animal adulte a également montré une modulation du niveau d'anxiété, davantage marquée chez les animaux exposés à la plus faible concentration (1,5 ppb) qu'à celle plus élevée (150 ppb). La présence de métabolites du fluorène au niveau du cerveau des animaux soumis aux deux niveaux d'exposition testés a également permis de montrer la capacité de ce polluant à atteindre le compartiment cérébral et à être métabolisé, confirmant par là-même la pertinence de ce modèle d'exposition par voie inhalatoire.

Enfin, les études des effets de l'exposition de femelles gestantes ou allaitantes à une atmosphère contaminée avec du fluorène aux deux mêmes concentrations que chez l'animal adulte ont montré l'existence chez les jeunes de troubles transitoires et réversibles de la maturation des fonctions sensori-motrices. Par contre, des effets retardés de l'exposition au polluant ont été observés chez les animaux à l'âge adulte dans les deux études, reflétés par des modifications du niveau d'anxiété et de l'activité, davantage marquées à 1,5 ppb chez les animaux exposés *in utero* et à 150 ppb chez les animaux ayant été exposés au cours de la lactation. Ces résultats permettent ainsi de souligner l'influence du type de transfert (placentaire ou lactationnel) sur l'intensité des troubles observés, les registres comportementaux perturbés restant les mêmes dans les deux cas.

Les études réalisées permettent ainsi de conclure à une toxicité comportementale du fluorène chez l'animal adulte exposé directement par voie injectable, par ingestion ou par inhalation, et chez l'animal

indirectement contaminé via l'exposition de la mère gestante ou allaitante. Dans tous les cas, une perturbation du niveau d'anxiété a été mise en évidence qui est modulée suivant la voie d'entrée de la molécule, le niveau de contamination testé et la période d'exposition. Un effet sensible sur l'activité locomotrice a également été observé alors qu'aucune atteinte des capacités d'apprentissage et de mémorisation à court et à long terme n'a été révélée.

Par ailleurs, il est à noter que des effets non monotones ont été observés selon les doses utilisées que ce soit dans les études menées chez l'animal adulte ou chez les jeunes exposés au cours de la phase précoce du développement. De plus, une interaction avec le sexe a été observée dans les études de développement, probablement liée à des effets du polluant sur la maturation de l'axe endocrinien des animaux. Enfin, des résultats différents ont été constatés selon la période d'exposition (gestation ou lactation), suggérant un rôle modulateur de l'organisme maternel dans la toxicité de ce polluant pour le cerveau en développement, ainsi que des modalités de transfert entre le compartiment maternel et le jeune différentes du fait des propriétés physiologiques très différentes des barrières placentaires et mammaires.

Au final, l'ensemble de ces résultats permettent de conclure au potentiel neurotoxique du fluorène et montre ainsi l'importance de la question de l'évaluation du risque de l'exposition à des composés de type HAP à de faibles niveaux de contamination tout au long de la vie de l'individu.

Ce travail ouvre plusieurs perspectives du fait des interrogations qu'il a levées.

Premièrement, aucune donnée pharmacocinétique et très peu de données toxicologiques étant disponibles sur le fluorène, les mécanismes fonctionnels du devenir du polluant dans l'organisme ne sont pas connus et ne peuvent pas être précisés dans l'instant. Pour compléter l'interprétation des résultats obtenus, il serait intéressant de déterminer comment la voie d'entrée affecte la distribution du fluorène au niveau cérébral en établissant le profil pharmacocinétique de la molécule. A partir des échantillons prélevés au cours des trois études réalisées chez l'adulte, il serait pertinent d'analyser la présence du fluorène et de ses métabolites dans d'autres compartiments (foie, plasma) pour établir la transformation de la molécule mère et cerner le rôle du métabolisme périphérique dans le transfert du contaminant au niveau cérébral. Un autre marqueur basé sur la mesure de l'induction de l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (activité EROD), pourrait également être testé sur ces prélèvements pour compléter le rôle du métabolisme du composé.

Le prélèvement et l'analyse d'autres tissus (poumon, placenta) et matrices biologiques (urine, lait et sang maternel, sang des jeunes) auraient également contribué à mieux comprendre la part du métabolisme du fluorène chez l'animal adulte et le transfert *in utero* et lactationnel du composé.

Deuxièmement, la mesure au niveau régional d'un indicateur de l'activité fonctionnelle cérébrale comme celui de la cytochrome oxydase par une technique histochimique permettrait de déterminer la sensibilité au fluorène des régions du cerveau impliquées dans la régulation de ces comportements et ainsi, de fournir des premiers éléments de réponse quant à la sensibilité du cerveau à la présence de ce polluant et au mécanisme d'action possible de cette molécule. Aucune connaissance n'étant actuellement disponible sur un mécanisme d'action supposé de ce polluant, l'étude du métabolisme général comme du métabolisme cérébral avec des outils de type métabolomique pourrait être réalisée de manière à cerner les effets d'une telle contamination sur la physiologie générale et cérébrale de l'individu et d'identifier des cibles métaboliques potentielles susceptibles d'être affectées par ce polluant.

Troisièmement, l'étude des effets de l'exposition directe du jeune à l'inhalation de fluorène permettrait d'apprécier la sensibilité directe du cerveau à la contamination et, en comparaison des résultats obtenus aux deux études d'exposition via la mère, de déterminer le rôle de l'organisme maternel dans l'intoxication du nouveau né.

De même, l'évaluation à plus long terme des animaux adultes aurait permis de déterminer si les effets comportementaux observés persistent dans le temps, auquel cas il aurait été possible de poser la question de l'influence d'une exposition à un tel polluant dans l'apparition de maladies neurodégénératives, comme cela a été montré suite à l'exposition à la pollution atmosphérique (Thomson *et al.* 2007) et à certains POP, tels que les pesticides (Parrón *et al.* 2011, Franco *et al.* 2010, Le Couteur *et al.* 1999).

Enfin, ce travail ayant montré le risque qu'il peut exister de l'exposition par voie inhalatoire à des polluants comme le fluorène à des niveaux d'exposition bien inférieurs à ceux observés par voie alimentaire, il constitue un argument pouvant motiver la réalisation d'autres travaux visant à évaluer les effets de l'inhalation d'autres HAP, ainsi que de l'inhalation de plusieurs composés de cette famille ou d'autres familles de polluants, pour appréhender les différences existant entre l'exposition à des molécules seules et des mélanges de composés. Ces études pourraient ainsi être comparées avec d'autres travaux menés au laboratoire, consistant en l'évaluation des effets de l'ingestion d'un mélange de 16 HAP, permettant ainsi d'établir la nature et l'importance des effets susceptibles d'être induits à

des niveaux environnementaux d'exposition par les deux voies d'entrées principales de la contamination. Bien que plus pertinentes, du fait qu'elles modéliseraient des cas d'expositions plus réalistes, ces études seraient néanmoins techniquement très difficiles à mettre en œuvre, en particulier au niveau de la génération et de la métrologie des atmosphères contaminées.

Une approche pertinente dans la problématique de la pollution atmosphérique serait aussi d'étudier le rôle de la phase particulaire (aérosols et/ou suspensions de particules fines adsorbées avec des polluants) dans la vectorisation et la disponibilité de ces molécules au niveau cérébral, et donc dans les effets potentiellement neurotoxiques des polluants atmosphériques.

Bibliographie

- Abballe A, Ballard TJ, Dellatte E, Domenico Ad, Ferri F, Fulgenzi AR, Grisanti G, Iacovella N, Ingelido AM, Malisch R, Miniero R, Porpora MG, Risica S, Ziemacki G, Felip ED. Persistent environmental contaminants in human milk: Concentrations and time trends in Italy. (2008) *Chemosphere* **73**(1 SUPPL):S220-S227.
- Abdelrahim M, Ariazi E, Kim K, Khan S, Barhoumi R, Burghardt R, Liu S, Hill D, Finnell R, Wlodarczyk B, Jordan VC, Safe S. 3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha. (2006) *Cancer Research* **66**(2):2459-2467.
- Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y. Prenatal psychological stress causes higher emotionality depression-like behavior and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. (2007) *Neuroscience Research* **59**(2):145-151.
- Abraham K, Pöpke O, Gross A, Kordonouri O, Wiegand S, Wahn U, Helge H. Time course of PCDD/PCDF/PCB concentrations in breast-feeding mothers and their infants. (1998) *Chemosphere* **37**(9-12):1731-1741.
- Ackerman SH, Hofer MA, Weiner H. Some effects of a split litter cross foster design applied to 15 day old rat pups. (1977) *Physiology and Behavior* **19**(3):433-436.
- Agnish ND, Keller KA. The rationale for culling of rodent litters. (1997) *Fundamental and Applied Toxicology* **38**(1):2-6.
- Aguilera G. Corticotropin releasing hormone receptor regulation and the stress response. (1998) *Trends in Endocrinology and Metabolism* **9**:329-36.
- Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. (1995) *Brain Research* **677**(1):13-19.
- Allen BC, Crump KS, Shipp AM. Correlation between carcinogenic potency of chemicals in animals and humans. (1988) *Risk Analysis* **8**(4):531-544.
- Allen JO, Dookeran NM, Smith KA, Sarofim AF, Taghizadeh K, Lafleur AL. Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with size-segregated atmospheric aerosols in Massachusetts. (1996) *Environmental Science and Technology* **30**(3):1023-1031.
- Alsberg T, Hakansson S, Strandell M, Westerholm R. Profile analysis of urban air pollution. (1989) *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **7**(1-2):143-152.
- Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. (1975) *Animal Behaviour* **23** (4):896-920.
- Amorim LCA, Dimandja JM, Cardeal Zdl. Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. (2009) *Journal of Chromatography A* **1216**:2900-4.
- Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. (2000) *Toxicology* **144**(1-3):121-127.
- Anderson LM, Jones AB, Miller MS, Chauhan DP. Metabolism of transplacental carcinogens. (1989) *IARC scientific publications* (96):155-188.
- Andersson H, Lindqvist E, Westerholm R, Grägg K, Almén J, Olson L. Neurotoxic effects of fractionated diesel exhausts following microinjections in rat hippocampus and striatum. (1998) *Environmental Research* **76**(1):41-51.
- Andrade MMM, Tomé MF, Santiago ES, Lúcia-Santos A, De Andrade TGCS. Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. (2003) *Physiology and Behavior* **78**(1):125-133.
- ANSES – Proposition de valeurs guides de qualité d'air intérieur. Avis de l'ANSES. Rapport d'expertise collective. Avril 2011.
- Archibong AE, Inyang F, Ramesh A, Greenwood M, Nayyar T, Kopsombut P, Hood DB, Nyanda AM. Alteration of pregnancy related hormones and fetal survival in F-344 rats exposed by inhalation to benzo(a)pyrene. (2002) *Reproductive Toxicology* **16**(6):801-808.
- Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review and meta-analysis. (2004) *Environmental Health Perspectives* **112**(9):970-978.

- ATSDR - Toxicological Profiles for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Agency for Toxic Substances and Disease Registry Atlanta GA: US department of Health and Human Services Public Health Services. (1995) <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>
- Avery DL, Spyker JM. Foot tattoo of neonatal mice. (1977) *Laboratory Animal Science* **27**(1):110-111.
- Bae SY, Yi SM, Kim YP. Temporal and spatial variations of the particle size distribution of PAHs and their dry deposition fluxes in Korea. (2002) *Atmospheric Environment* **36**(35):5491-5500.
- Baek SO, Field RA, Goldstone ME, Kirk PW, Lester JN, Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources fate and behavior. (1991) *Water Air and Soil Pollution* **60**(3-4):279-300.
- Bai N, Khazaei M, van Eeden SF, Laher I. The pharmacology of particulate matter air pollution-induced cardiovascular dysfunction. (2007) *Pharmacology and Therapeutics* **113**(1):16-29.
- Baker S, Chebli M, Rees S, LeMarec N, Godbout R, Bielajew C. Effects of gestational stress: 1 Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. (2008) *Brain Research* **1213**:98-110.
- Barbieri O, Ognio E, Rossi O. Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in Swiss mice. (1986) *Cancer Research* **46**(1):94-98.
- Barker DJP. The developmental origins of adult disease. (2004) *Journal of the American College of Nutrition* **23**(6 SUPPL):588S-595S.
- Barlow S, Knight A, Sullivan F. Delay in postnatal growth and development in offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. (1978) *Teratology* **18**:211-218.
- Barton HA. Computational pharmacokinetics during developmental windows of susceptibility. (2005) *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **68**:889-900.
- Beck KD, Luine VN. Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress: Role of housing conditions. (2002) *Physiology and Behavior* **75**(5):661-673.
- Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. (2001) *Behavioural Brain Research* **125**(1-2):141-149.
- Bemis JC, Seegal RF. Polychlorinated biphenyls and methylmercury act synergistically to reduce rat brain dopamine content in vitro. (1999) *Environmental Health Perspectives* **107**:879-885.
- Bi X, Sheng G, Peng P, Chen Y, Zhang Z, Fu J. Distribution of particulate and vapor- phase n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban atmosphere of Guangzhou, China. (2003) *Atmospheric Environment* **37**:289-298.
- Bidleman TF. Atmospheric processes. (1988) *Environmental Science and Technology* **22**(4):361-367.
- Bignall KE. Ontogeny of levels of neural organization: the righting reflex as a model. (1974) *Experimental Neurology* **42**(3):566-573.
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT. Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. (2008) *Toxicological Sciences* **105**:5-23.
- Bolles RC, Woods PJ. The ontogeny of behaviour in the albino rat. (1964) *Animal Behaviour* **12**(4):427-441.
- Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. (2000) *Toxicology and Applied Pharmacology* **167**:191-198.
- Boström C-E, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R. Cancer risk assessment indicators and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. (2002) *Environmental Health Perspectives* **110**(SUPPL 3):451-488.
- Bouayed J, Desor F, Rammal H, Kiemer AK, Tybl E, Schroeder H, Rychen G, Soulimani R. Effects of lactational exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) on postnatal neurodevelopment, neuronal receptor gene expression and behaviour in mice. (2009) *Toxicology* **259**(3):97-106.

- Bouayed J, Desor F, Soulimani R. Subacute oral exposure to benzo[α]pyrene (B[α]P) increases aggressiveness and affects consummatory aspects of sexual behaviour in male mice. (2009) *Journal of Hazardous Materials* **169**(1-3):581-585.
- Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. (2003) *European Journal of Pharmacology* **463**(1-3):55-65.
- Bowman RE, Ferguson D, Luine VN. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity spatial memory and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. (2002) *Neuroscience* **113**(2):401-410.
- Boyes WK. EPA's neurotoxicity risk assessment guidelines. (1997) *Toxicological Sciences* **40**(2):175-184.
- Brent RL. Utilization of juvenile animal studies to determine the human effects and risks of environmental toxicants during postnatal developmental stages. (2004) *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* **71**(5):303-320.
- Brown LA, Khoubouei H, Goodwin JS, Irvin-Wilson CV, Ramesh A, Sheng L, McCallister MM, Jiang GCT, Aschner M, Hood DB. Down-regulation of early ionotropic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo(a)pyrene. (2007) *NeuroToxicology* **28**(5 SPEC. ISS.):965-978.
- Bui QQ, Tran MB, West WL. A comparative study of the reproductive effects of methadone and benzo[α]pyrene in the pregnant and pseudopregnant rat. (1986) *Toxicology* **42**(2-3):195-204.
- Busby Jr WF, Stevens EK, Kellenbach ER, Cornelisse J, Lugtenburg J. Dose-response relationships of the tumorigenicity of cyclopenta[cd]pyrene benzo[α]pyrene and 6-nitrochrysene in a newborn mouse lung adenoma bioassay. (1988) *Carcinogenesis* **9**(5):741-746.
- Calderón-Garcidueñas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, Monroy S, Tizapantzi MDR, Carson JL, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B. Air pollution and brain damage. (2002) *Toxicologic Pathology* **30**(3):373-389.
- Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, Torres-Jardón R, Henriquez-Roldán C, Barragán-Mejía G, Valencia-Salazar G, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Villarreal-Calderón R, Reed W. Pediatric respiratory and systemic effects of chronic air pollution exposure: Nose lung heart and brain pathology. (2007) *Toxicologic Pathology* **35**(1):154-162.
- Caricchia AM, Chiavarini S, Pezza M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). (1999) *Atmospheric Environment* **33**(23):3731-3738.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. (2005) *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **29**(8):1193-1205.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. (2002) *Behavioural Brain Research* **134**(1-2):49-57.
- Carpenter DO, Arcaro KF, Bush B, Niemi WD, Pang S, Vakharia DD. Human health and chemical mixtures: an overview. (1998) *Environmental Health Perspectives* **106** (Suppl 6):1263-1270.
- Carr RL, Richardson JR, Guarisco JA, Kachroo A, Chambers JE, Couch TA, Durunna GC, Meek EC. Effects of PCB exposure on the toxic impact of organophosphorus insecticides. (2002) *Toxicological Sciences* **67**(2):311-321.
- Castellano C, Filibeck U, Oliverio A. Effects of heroin alone or in combination with other drugs on the locomotor activity in 2 inbred strains of mice. (1976) *Psychopharmacology* **49**(1):29-31.
- CERCLA - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. CERCLA Priority List. (2007) <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>
- Champagen FA, Meaney MJ. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. (2006) *Biol Psychiatry* **59**:1227-1235.
- Chahoud I, Paumgartten FJ. Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? (2009) *Environmental research* **109**(8):1021-1027.
- Charles GD, Bartels MJ, Zacharewski TR, Gollapudi BB, Freshour NL, Carney EW. Activity of benzo[α]pyrene and its hydroxylated metabolites in an estrogen receptor-alpha reporter gene assay. (2000) *Toxicological Sciences* **55**:320-326.

- Cherian SB, Bairy KL, Rao MS. Chronic prenatal restraint stress induced memory impairment in passive avoidance task in post weaned male and female wistar rats. (2009) *Indian Journal of Experimental Biology* **47**(11):893-899.
- Cherian SB, Bairy KL, Rao MS, Somayaji SN, Ramnarayan K. Effects of chronic prenatal restraint stress on anxiety in post weaned male and female wistar rats. (2010) *Pharmacologyonline* **2**:99-122.
- Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. Influences of laboratory environment on behavior [1]. (2002) *Nature Neuroscience* **5**(11):1101-1102.
- Choi H, Jedrychowski W, Spengler J, Camann DE, Whyatt RM, Rauh V, Tsai W-Y, Perera FP. International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. (2006) *Environmental Health Perspectives* **114**(11):1744-1750.
- Choi H, Rauh V, Garfinkel R, Tu Y, Perera FP. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of intrauterine growth restriction. (2008) *Environmental Health Perspectives* **116**(5):658-665.
- Chu I, Bowers WJ, Caldwell D, Nakai J, Wade MG, Yagminas A, Li N, Moir D, Abbas LE, Håkansson H, Gill S, Mueller R, Pulido O. Toxicological effects of in utero and lactational exposure of rats to a mixture of environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations. (2008) *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **71**(2):93-108.
- Chuang JC, Callahan PJ, Lyu CW, Wilson NK. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. (1999) *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* **9**(2):85-98.
- Cincinelli A, Stefani A, Costantini SS, Lepri L. Characterization of n-alkanes and PAHS in PM10 samples in Prato (Italy). (2004) *Annali di Chimica* **94**(4):281-293.
- CITEPA - (2010)
http://www.citepa.org/emissions/nationale/Pop/pop_hap.htm
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. (2001) *Neuroscience* **105**(1):7-17.
- Clénet F, Bouyon E, Hascoët M, Bourin M. Light/dark cycle manipulation influences mice behaviour in the elevated plus maze. (2006) *Behavioural Brain Research* **166**(1):140-149.
- Conceição GMS, Miraglia SGEK, Kishi HS, Saldiva PHN, Singer JM. Air pollution and child mortality: A time-series study in São Paulo Brazil. (2001) *Environmental Health Perspectives* **109**(SUPPL 3):347-350.
- Cordier S, Mandereau L, Preston-Martin S, Little J, Lubin F, Mueller B, Holly E, Filippini G, Peris-Bonet R, McCredie M, Choi NW, Arslan A. Parental occupations and childhood brain tumors: Results of an international case-control study. (2001) *Cancer Causes and Control* **12**(9):865-874.
- Cordier S, Lefevre B, Filippini G, Peris-Bonet R, Farinotti M, Lovicu G, Mandereau L. Parental occupation occupational exposure to solvents and polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of childhood brain tumors (Italy France Spain). (1997) *Cancer Causes and Control* **8**(5):688-697.
- Cordier S, Monfort C, Filippini G, Preston-Martin S, Lubin F, Mueller BA, Holly EA, Peris-Bonet R, McCredie M, Choi W, Little J, Arslan A. Parental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the risk of childhood brain tumors: The SEARCH international childhood brain tumor study. (2004) *American Journal of Epidemiology* **159**(12):1109-1116.
- Cotham WE, Bidleman TF. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in air at an urban and a rural site near lake Michigan. (1995) *Environmental Science and Technology* **29**(11):2782-2789.
- Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. (1985) *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **9**(1):37-44.
- Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. (1981) *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **15**(5):695-699.
- Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. (1980) *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **13**(2):167-170.

- Deviterne D, Desor D, Krafft B. Maternal behavior variations and adaptations and pup development within litters of various sizes in Wistar rat. (1990) *Developmental Psychobiology* **23**(4):349-360.
- Diapouli E, Chaloulakou A, Spyrellis N. Indoor and outdoor particulate matter concentrations at schools in the Athens area. (2007) *Indoor and Built Environment* **16**(1):55-61.
- Dickerson PA, Lally BE, Gunnell E, Kirkle DL, Salm AK. Early emergence of increased fearful behavior in prenatally stressed rats. (2005) *Physiol Behav* **86**:586-593.
- Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. (1979) *Early Human Development* **3**(1):79-83.
- Dorman DC, Allen SL, Byczkowski JZ, Claudio L, Fisher JE, Jr Fisher JW, Harry GJ, Li AA, Makris SL, Padilla S, Sultatos LG, Mileson BE. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment. III: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. (2001) *Environmental Health Perspectives* **109** (Suppl 1):101-111.
- Dorman DC, Brenneman KA, McElveen AM, Lynch SE, Roberts KC, Wong BA. Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. (2002) *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **65**:1493-1511.
- Dor F, Mandin C, Kirchner S. La qualité d'air intérieur : une thématique en dynamique. Archives des maladies professionnelles et de l'environnement, 71/5. Octobre 2010, pp 806-812. [doi:10.1016/j.admp.2010.09.003]
- Duboudin C. Pollution inside the home: descriptive analyses. Part I: Analysis of the statistical correlations between pollutants inside homes. Environnement Risques & Santé, 8/6, Novembre-Décembre 2009, pp 485-496.
- Dubovicky M, Jezova D. Effect of chronic emotional stress on habituation processes in open field in adult rats. (2004) *Ann N Y Acad Sci* **1018**:199-206.
- EC (European Commission) - Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. (2002)
- EC - State of the Art Report on Mixture Toxicity – Final Report, Executive Summary, December 2009.
- EC - Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures -Preliminary Opinion approved for Public Consultation. Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), June 2011.
- Edwards SC, Jedrychowski W, Butscher M, Camann D, Kieltyka A, Mroz E, Flak E, Li Z, Wang S, Rauh V, Perera F. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland. (2010) *Environmental Health Perspectives* **118**(9):1326-1331.
- Environmental Working Group - Body Burden - The Pollution in Newborns. A benchmark investigation of industrial chemicals, pollutants and pesticides in umbilical cord blood, July 14, 2005.
- Eriksson P. Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. (1997) *NeuroToxicology* **18**(3):719-726.
- Eriksson P, Ankarberg E, Viberg H, Fredriksson A. The developing cholinergic system as target for environmental toxicants nicotine and polychlorinated biphenyls (PCBs): Implications for neurotoxicological processes in mice. (2001) *Neurotoxicity Research* **3**(1):37-51.
- Eriksson P, Talts U. Neonatal exposure to neurotoxic pesticides increases adult susceptibility: A review of current findings. (2000) *NeuroToxicology* **21**(1-2):37-48.
- Evans J, Hastings L. Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: intraperitoneal, intratracheal, or intranasal. (1992) *Fundamental and Applied Toxicology* **19**:275-278.
- Fabia J, Thuy TD. Occupation of father at time of birth of children dying of malignant diseases. (1974) *British Journal of Preventive and Social Medicine* **28**(2):98-100.
- Fang GC, Wu YS, Chen JC, Chang CN, Ho TT. Characteristic of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and source identification for fine and coarse particulates at Taichung Harbor near Taiwan Strait during 2004-2005. (2006) *Science of the Total Environment* **366**(2-3):729-738.

- Fang GC, Wu YS, Chen JC, Fu PPC, Chang CN, Ho TT, Chen MH. Characteristic study of polycyclic aromatic hydrocarbons for fine and coarse particulates at Pastureland near Industrial Park sampling site of central Taiwan. (2005) *Chemosphere* **60**(3):427-433.
- Fernandes C, File SE. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. (1996) *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **54**(1):31-40.
- Fertuck KC, Kumar S, Sikka HC, Matthews JB, Zacharewski TR. Interaction of PAH-related compounds with the α and β isoforms of the estrogen receptor. (2001) *Toxicology Letters* **121**(3):167-177.
- Forearm WT, Bidleman TF. Semivolatile organic compounds in the ambient air of Denver, Colorado. (1990) *Atmospheric Environment - Part A General Topics* **24A**(9):2405-2416.
- Fox MW. Natural environment: theoretical and practical aspects for breeding and rearing laboratory animals. (1966) *Laboratory animal care* **16**(4):316-321.
- Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. (1965) *Animal Behaviour* **13**(2-3):234-240 IN3-IN5241.
- Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. (2010) *Chemico-Biological Interactions* **188**:289-300.
- Gamboa RT, Gamboa AR, Bravo AH, Ostrosky WP. Genotoxicity in child populations exposed to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the air from Tabasco, Mexico. (2008) *International Journal of Environmental Research and Public Health* **5**(5):349-355.
- Gammie SC, Stevenson SA. Effects of daily and acute restraint stress during lactation on maternal aggression and behavior in mice. (2006) *Stress* **9**(3):171-180.
- Gelly JL. Effets d'une sous-alimentation quantitative sur la rate et ses jeunes. Etude du développement sensori-moteur à l'aide d'une échelle cohérente de tests. Présentée pour l'obtention du doctorat de 3^{ème} cycle en neurobiologie et biologie du comportement. Nancy, Université Nancy 1. (1979) 151 pages.
- Gershbein LL. Liver regeneration as influenced by the structure of aromatic and heterocyclic compounds. (1975) *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* **11**(3):445-466.
- Gladen BC. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. (2000) *Human and Experimental Toxicology* **19**(11):597-603.
- Gmeiner G, Gärtner P, Krassnig C, Tausch H. Identification of various urinary metabolites of fluorene using derivatization solid-phase microextraction. (2002) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **766**(2):209-218.
- Gmeiner G, Stehlik G, Tausch H. Determination of seventeen polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke condensate. (1997) *Journal of Chromatography A* **767**(1-2):163-169.
- Goldman LR, Koduru S. Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: A public health and policy perspective. (2000) *Environmental Health Perspectives* **108**(SUPPL 3):443-448.
- Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The open field test. (2009) *Neuromethods* **42**:1-20.
- Grandjean P, Landrigan P. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. (2006) *Lancet* **368**:2167-2178.
- Grandjean P, White RF, Weihe P. Neurobehavioral epidemiology: Application in risk assessment. (1996) *Environmental Health Perspectives* **104**(SUPPL 2):397-400.
- Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. (2005) *Behavioural Brain Research* **156**(1):105-114.
- Grimm VE, Frieler B. The effects of mild maternal stress during pregnancy on the behavior of rat pups. (1987) *Int J Neurosci* **35**:65-72.
- Grota LJ, Ambruso D. The effects of premature delivery on subsequent development of the rat. (1973) *Developmental Psychobiology* **6**(5):475-480.

- Grova N, Feidt C, Crépineau C, Laurent C, Lafargue PE, Hachimi A, Rychen G. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(16):4640-4642.
- Grova N, Rychen G, Monteau F, Le Bizet B, Feidt C. Effect of oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on goat's milk contamination. (2006) *Agronomy for Sustainable Development* **26**(3):195-199.
- Grova N, Schroeder H, Farinelle S, Prodhomme E, Valley A, Muller CP. Sub-acute administration of benzo[a]pyrene (B[a]P) reduces anxiety-related behaviour in adult mice and modulates regional expression of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors genes in relevant brain regions. (2008) *Chemosphere* **73**:S295-S302.
- Grova N, Salquère G, Schroeder H, Appenzeller BMR. Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. (2011) *Chemical Research in Toxicology* soumis après corrections.
- Grova N, Valley A, Turner JD, Morel A, Muller CP, Schroeder H. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. (2007) *NeuroToxicology* **28**:630-636.
- Grover PL. Pathways involved in the metabolism and activation of polycyclic hydrocarbons. (1986) *Xenobiotica* **16**(10-11):915-931.
- Gué M, Bravard A, Meunier J, Veyrier R, Gaillet S, Recasens M, Maurice T. Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. (2004) *Behavioral Brain Research* **150**:149-157.
- Guo H, Lee SC, Ho KF, Wang XM, Zou SC. Particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. (2003) *Atmos Environ* **37**:5307-5317.
- Gurtoo HL, Williams CJ, Gottlieb K. Population distribution of placental benzo(a)pyrene metabolism in smokers. (1983) *International Journal of Cancer* **31**(1):29-37.
- Haggerty GC. Development of tier I neurobehavioral testing capabilities for incorporation into pivotal rodent safety assessment studies. (1989) *Journal of the American College of Toxicology* **8**(1):53-69.
- Hall CS, Ballechey EL. A study of the rat's behavior in a field: A contribution to method in comparative psychology. (1932) *University of California Publications in Psychology* **6**:1-12.
- Halsall CJ, Lee RGM, Coleman PJ, Burnett V, Jones PH, Jones KC. PCBs in UK urban air. (1995) *Environmental Science Technology* **29**:2368-2376.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. (1984) *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **327**(1):1-5.
- Harris RBS, Gu H, Mitchell TD, Endale L, Russo M, Ryan DH. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. (2004) *Physiology and Behavior* **81**(4):557-568.
- He J, Balasubramanian R. A study of gas/particle partitioning of SVOCs in the tropical atmosphere of Southeast Asia. (2009) *Atmospheric Environment* **43**(29):4375-4383.
- Hill LB, Keating M. Children at risk Clean Air Task Force. (2002)
- Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, Van Den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: A cohort study. (2002) *Lancet* **360**(9341):1203-1209.
- Holl A. Selective staining by procion dyes of olfactory sensory neurons in the catfish *Ictalurus nebulosus*. (1980) *Bioscientific* **35**:526-528.
- Hood DB, Nayyar T, Ramesh A, Greenwood M, Inyang F. Modulation in the developmental expression profile of Sp1 subsequent to transplacental exposure of fetal rats to desorbed benzo[a]pyrene following maternal inhalation. (2000) *Inhalation Toxicology* **12**(6):511-535.
- Hougaard KS, Andersen MB, Hansen ÅM, Hass U, Werge T, Lund SP. Effects of prenatal exposure to chronic mild stress and toluene in rats. (2005) *Neurotoxicology and Teratology* **27**(1):153-167.

Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. (1999) *Nature* **401**:763-764.

HSDB - Fluorene Hazardous Substances Data Bank National Library of Medicine. (2001)
<http://www.toxnet.nlm.nih.gov>

Huel G, Godin J, Frery N, Girard F, Moreau T, Nessmann C, Blot P. Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human placenta and threatened preterm delivery. (1993) *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* **3** Suppl 1:187-199.

IARC - Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Related Industrial Exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 92. Lyon:International Agency for Research on Cancer. (2010)

IARC - Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 45. Occupational Exposures in Petroleum Refining, Crude Oil and Major Petroleum Fuels. Lyon. (1989) pp. 159-201, 219-237.

IARC - Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemical to humans IARC. (1987)
<http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc/iarc740.htm>

IARC - Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Polynuclear aromatic compounds. Vol 32, Part 1, Chemical, environmental and experimental data. Lyon. (1983)

IARC - Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 3. Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds. Lyon. (1973)

IFEN - L'environnement en France. (2006)
<http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/publications/publication/158/1097/lenvironnement-france-edition-2006.html>

INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Fluorène. Institut National de la Recherche Industrielle et des Risques –DRC-02-25590-02DF50.doc (2005)

INRS – Modélisation des expositions professionnelles aux agents chimiques. Bilan et perspectives. *Hygiène et sécurité au travail*. 3^{ème} trimestre 2010.

Inyang F, Ramesh A, Kopsombut P, Niaz MS, Hood DB, Nyanda AM, Archibong AE. Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a)pyrene. (2003) *Reproductive Toxicology* **17**(5):527-537.

Irvine RJ, White J, Chen R. The influence of restraint on blood pressure in the rat. (1997) *J Pharmacol Toxicol Methods* **38**:157-162.

Jacobs GH, Fenwick JA, Williams GA. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. (2001) *Journal of Experimental Biology* **204**(14):2439-2446.

Jacobson JL, Jacobson SW. Association of prenatal exposure to an environmental contaminant with intellectual function in childhood. (2002) *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* **40**(4):467-475.

Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls *in utero*. (1996) *New England Journal of Medicine* **335**(11):783-789.

Jakab GJ, Hemenway DR. Restraint of animals required for nose-only inhalation toxicologic studies suppresses pulmonary antibacterial defenses. (1989) *Inhal Toxicol* **1**:289-300.

Jedrychowski W, Whyatt RM, Camann DE, Bawle UV, Peki K, Spengler JD, Dumyahn TS, Penar A, Perera FF. Effect of prenatal PAH exposure on birth outcomes and neurocognitive development in a cohort of newborns in Poland Study design and preliminary ambient data. (2003) *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **16**(1):21-29.

Jensen TE, Hites RA. Aromatic diesel emissions as a function of engine conditions. (1983) *Analytical Chemistry* **55**(4):594-599.

- Johnson CC, Spitz MR. Childhood nervous system tumours: An assessment of risk associated with paternal occupations involving use repair or manufacture of electrical and electronic equipment. (1989) *International Journal of Epidemiology* **18**(4):756-762.
- Keller CD, Bidleman TF. Collection of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and other organics with a glass fiber filter-polyurethane foam system. (1984) *Atmospheric Environment - Part A General Topics* **18**(4):837-845.
- Kendler KS. Gender differences in the genetic epidemiology of major depression. (1998) *The Journal of Gender-Specific Medicine* **1**:28-31.
- Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO. Stressful life events and previous episodes in the etiology of major depression in women: an evaluation of the "kindling" hypothesis. (2000) *American Journal of Psychiatry* **157**:1243-1251.
- Kerr MA, Nasca PC, Mundt KA, Michalek AM, Baptiste MS, Mahoney MC. Parental occupational exposures and risk of neuroblastoma: A case-control study (United States). (2000) *Cancer Causes and Control* **11**(7):635-643.
- Kilburn KH, Warshaw RH. Neurotoxic effects from residential exposure to chemicals from an oil reprocessing facility and superfund site. (1995) *Neurotoxicology and Teratology* **17**(2):89-102.
- Kilfoil T, Michel A, Montgomery D, Whiting RL. Effects of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety in mice. (1989) *Neuropharmacology* **28**(9):901-905.
- Kim SR, Halden RU, Buckley TJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking US women. (2008) *Environmental Science and Technology* **42**(7):2663-2667.
- Kim A, Park M, Yoon TK, Lee WS, Ko J-J, Lee K, Bae J. Maternal exposure to benzo[b]fluoranthene disturbs reproductive performance in male offspring mice. (2011) *Toxicology Letters* **203**(1):54-61.
- King-Herbert AP, Hesterburg TW, Thevenaz PP, Hamm Jr TE, Moss OR, Janszen DB, Everitt JI. Effects of Immobilization Restraint on Syrian Golden Hamsters. (1997) *Laboratory Animal Science* **47**(4):362-366.
- Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Akiyama S, Nakashima K. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. (2003) *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **789**(2):257-264.
- Knuckles ME, Inyang F, Ramesh A. Acute and subchronic oral toxicity of fluoranthene in F-344 rats. (2004) *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**(1):102-108.
- Konstandi M, Harkitis P, Thermos K, Ogren SO, Johnson EO, Tzimas P, Marselos M. Modification of inherent and drug-induced dopaminergic activity after exposure to benzo(a)pyrene. (2007) *NeuroToxicology* **28**(4):860-867.
- Konstandi M, Pappas P, Johnson E, Lecklin A, Marselos M. Suppression of the acquisition of conditioned avoidance behavior in the rat by 3-methylcholanthrene. (1997) *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* **56**:637-641.
- Kornstein SG. Gender differences in depression: implications for treatment. (1997) *Journal of Clinical Psychiatry* **58** (Suppl 15):12-18.
- Kot-Wasik A. Studies on fluorene stability in different liquid media. (2004) *Analytica Chimica Acta* **505**(2):289-299.
- Kraemer PJ, Gilbert ME, Innis NK. The influence of cue type and configuration upon radial-maze performance in the rat. (1983) *Animal Learning and Behavior* **11**(3):373-380.
- Kristensen P, Andersen A. A cohort study on cancer incidence in offspring of male printing workers. (1992) *Epidemiology* **3**(1):6-10.
- Kristensen P, Andersen A, Irgens LM, Bye AS, Sundheim L. Cancer in offspring of parents engaged in agricultural activities in Norway: Incidence and risk factors in the farm environment. (1996) *International Journal of Cancer* **65**(1):39-50.
- Kristensen P, Eilertsen E, Einarsdottir E, Haugen A, Skaug V, Ovrega S. Fertility in mice after prenatal exposure to benzo[a]pyrene and inorganic lead. (1995) *Environmental Health Perspectives* **103**(6):588-590.
- Kulkarni P, Venkataraman C. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Mumbai, India. (2000) *Atmospheric Environment* **34**(17):2785-2790.

- Kummer V, Mašková J, Zralý Z, Neča J, Šimečková P, Vondráček J, Machala M. Estrogenic activity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in uterus of immature Wistar rats. (2008) *Toxicology Letters* **180**(3):212-221.
- Lamberty Y, Gower AJ. Arm width and brightness modulation of spontaneous behaviour of two strains of mice tested in the elevated plus-maze. (1996) *Physiology and Behavior* **59**(3):439-444.
- Larsson P, Tjälve H.. Intranasal instillation of aflatoxin B(1) in rats: bioactivation in the nasal mucosa and neuronal transport to the olfactory bulb. (2000) *Toxicological Sciences* **55**:383-391.
- Lavoie EJ, Braley J, Rice JE, Rivenson A. Tumorigenic activity of non-alternant polynuclear aromatic hydrocarbons in newborn mice. (1987) *Cancer Letters* **34**(1):15-20.
- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. Pesticides and Parkinson's disease. (1999) *Biomedicine and Pharmacotherapy* **53**(3):122-130.
- Lee BM, Baoyun Y, Herbert R, Hemminki K, Perera FP, Santella RM. Immunologic measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin adducts in foundry workers and roofers. (1991) *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* **17**(3):190-194.
- Lee SC, Ho KF, Chan LY, Zielinska B, Chow JC. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in urban atmosphere of Hong Kong. (2001) *Atmospheric Environment* **35**(34):5949-5960.
- Legraverend C, Guenther TM, Nebert DW. Importance of the route of administration for genetic differences in benzo[a]pyrene-induced in utero toxicity and teratogenicity. (1984) *Teratology* **29**(1):35-47.
- Lerario VL, Giandomenico S, Lopez L, Cardellicchio N. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH S) in sediments from the Mar Piccolo of Taranto Ionian Sea Southern Italy. (2003) *Annali di Chimica* **93**(4):397-406.
- Lewis RG, Kelly TJ, Chuang JC, Callahan PJ, Coutart RW. Phase distributions of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons in two U.S. cities. Proceedings of the 9th World Clean Air Congress & Exhibition, Montreal, Canada. (1991).
- Li Z, Mulholland JA, Romanoff LC, Pittman EN, Trinidad DA, Lewin MD, Sjödin A. Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. (2010) *Journal of Environmental Monitoring* **12**(5):1110-1118.
- Li Z, Sandau CD, Romanoff LC, Caudill SP, Sjödin A, Needham LL, Patterson Jr DG. Concentration and profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population. (2008) *Environmental Research* **107**(3):320-331.
- Lin DM, Ngai J. Development of the vertebrate main olfactory system. (1999) *Current Opinion in Neurobiology* **9**(1):74-78.
- Lindstedt G, Sollenberg J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the occupational environment with special reference to benzo[a]pyrene measurements in Swedish industry. (1982) *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* **8**(1):1-19.
- Ling S, Jamali F. Effect of cannulation surgery and restraint stress on the plasma corticosterone concentration in the rat: Application of an improved corticosterone hplc assay. (2003) *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **6**:246-51.
- Liu S, Tao S, Liu W, Liu Y, Dou H, Zhao J, Wang L, Wang J, Tian Z, Gao Y. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in north China: A winter-time study. (2007) *Environmental Science and Technology* **41**(24):8256-8261.
- Liu YN, Tao S, Dou H, Zhang TW, Zhang XL, Dawson R. Exposure of traffic police to Polycyclic aromatic hydrocarbons in Beijing China. (2007) *Chemosphere* **66**(10):1922-1928.
- Llewellyn AM, Stowe ZN, Nemeroff CB. Depression during pregnancy and the puerperium. (1997) *Journal of Clinical Psychiatry* **58**:26-32.
- Lodovici M, Dolara P, Casalini C, Ciappellano S, Testolin G. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. (1995) *Food Additives and Contaminants* **12**(5):703-713.
- MacKenzie KM, Angevine DM. Infertility in mice exposed in utero to benzo(a)pyrene. (1981) *Biology of Reproduction* **24**:183-191.

- Madhavan ND, Naidu KA. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta maternal blood umbilical cord blood and milk of Indian women. (1995) *Human and Experimental Toxicology* **14**(6):503-506.
- Majchrzak R, Sroczyński J, Chelmecka E. Evaluation of the nervous system in workers in the furnace and coal divisions of the coke-producing plants. (1990) *Medycyna pracy* **41**(2):108-113.
- Mandalakis M, Tsapakis M, Tsoqa A, Stephanou EG. Gas-particle concentrations and distribution of aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and PCDD/Fs in the atmosphere of Athens (Greece). (2002) *Atmospheric Environment* **36**:4023-4035.
- Marczynski B, Pesch B, Wilhelm M, Rossbach B, Preuss R, Hahn J-U, Rabstein S, Raulf-Heimsoth M, Seidel A, Rihs H-P, Adams A, Scherenberg M, Erkes A, Engelhardt B, Straif K, Kafferlein HU, Angerer J, Bruning T. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage by industry: A nationwide study in Germany. (2009) *Archives of Toxicology* **83**(10):947-957.
- Marquez C, Nadal R, Armario A. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: Individual differences. (2004) *Neuroscience* **123**(3):601-612.
- Mautz WJ, Bufalino C. Breathing pattern and metabolic rate responses of rats exposed to ozone. (1989) *Respiration Physiology* **76**(1):69-78.
- Mazmanian DS, Roberts WA. Spatial memory in rats under restricted viewing conditions. (1983) *Learning and Motivation* **14**(2):123-139.
- McCallister MM, Maguire M, Ramesh A, Aimin Q, Liu S, Khoshbouei H, Aschner M, Ebner FF, Hood DB. Prenatal exposure to benzo(a)pyrene impairs later-life cortical neuronal function. (2008) *NeuroToxicology* **29**(5):846-854.
- McDougall SJ, Paull JRA, Widdop RE, Lawrence AJ. Residential stress: Differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. (2000) *Hypertension* **35**:126-129.
- Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: Levels and sources of variability. (1992) *Science of the Total Environment* **116**(1-2):109-135.
- Milesion BE, Ferenc SA. Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: Overview. (2001) *Environmental Health Perspectives* **109**(SUPPL 1):77-78.
- Milkovic K, Peruzovic M, Romic R. Differential effect of pre and postnatal litter size reduction on body weight and development of stress response in the rat. (1977) *Biology of the Neonate* **32**(1-2):83-93.
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. (2003) *Progress in Neurobiology* **70**(2):83-244.
- Morato S, Castrechini P. Effects of floor surface and environmental illumination on exploratory activity in the elevated plus-maze. (1989) *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **22**(6):707-710.
- Morley-Fletcher S, Mairesse J, Soumier A, Banasr M, Fagioli F, Gabriel C, Mocaer E, Daszuta A, McEwen B, Nicoletti F, Maccari S. Chronic agomelatine treatment corrects behavioral cellular and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats. (2011) *Psychopharmacology* 1-13, *sous presse*.
- Morley-Fletcher SM, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behavior and HPA axis reactivity. (2003) *European Journal of Neuroscience* **18**:3367-3374.
- Morris HP, Sidransky H, Wagner BP, Dyer HM. Some characteristics of transplantable rat hepatoma No 5123 induced by. (1960) *Cancer research* **20**:1252-1254.
- Morse DC, Stein AP, Thomas PE, Lowndes HE. Distribution and induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 in rat brain. (1998) *Toxicology and Applied Pharmacology* **152**:232-239.
- Mueller BR, Bale TL. Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. (2007) *Physiology and Behavior* **91**(1):55-65.
- Muhammad A, Kolb B. Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. (2011) *Behavioural Brain Research* **223**(1):7-16.

- Murai N, Hoshi K, Nakamura T. Effects of diagnostic ultrasound irradiated during fetal stage on development of orienting behavior and reflex ontogeny in rats. (1975) *Tohoku Journal of Experimental Medicine* **116**(1):17-24.
- Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona County Spain. (2004) *Environmental Pollution* **132**(1):1-11.
- Narciso SP, Nadziejko E, Chen LC, Gordon T, Nadziejko C. Adaptation to stress induced by restraining rats and mice in nose-only inhalation holders. (2003) *Inhalation Toxicology* **15**(11):1133-1143.
- Nasca PC, Baptiste MS, MacCubbin PA, Metzger BB, Carlton K, Greenwald P, Armbrustmacher VW, Earle KM, Waldman J. An epidemiologic case-control study of central nervous system tumors in children and parental occupational exposures. (1988) *American Journal of Epidemiology* **128**(6):1256-1265.
- Nayyar T, Zawia NH, Hood DB. Transplacental effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the temporal modulation of Sp1 DNA binding in the developing cerebral cortex and cerebellum. (2002) *Experimental and Toxicologic Pathology* **53**(6):461-468.
- Netto SM, Silveira R, Coimbra NC, Joca SRL, Guimarães FS. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. (2002) *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **26**(6):1135-1141.
- Neubert D, Tapken S. Transfer of benzo(a)pyrene into mouse embryos and fetuses. (1988) *Archives of Toxicology* **62**(2-3):236-239.
- New York City Department of Health *Vital Statistics* New York NY: New York City Department of Health. (1998)
- Nie JS, Zhang HM, Sun JY, Shi YT, Wang F, Zeng P, Wang LP, Song J, Wang J, Liu HJ, Niu Q. Characteristic of the neurobehavioral functional changes in coke oven workers. (2008) *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* **42**(1):25-29.
- Nicol CJ, Harrison ML, Laposa RR, Gimelshtein IL, Wells PG. A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. (1995) *Nature Genetics* **10**(2):181-187.
- Niu Q, Zhang H, Li X, Li M. Benzo[a]pyrene-induced neurobehavioral function and neurotransmitter alterations in coke oven workers. (2010) *Occupational and Environmental Medicine* **67**(7):444-448.
- OCDE - Guideline for Testing of Chemicals. Test No 426: Developmental Neurotoxicity Study. (2007)
- Odabasi M, Bardar N, Sofuoglu A, Tasdemir Y, Holsen TM. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chicago air. (1999) *The Science of the Total Environment* **227**:57-67.
- OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4: Health Effects / Test No 403: Acute Inhalation Toxicity. (2009)
- Ohl F. Testing for anxiety. (2003) *Clinical Neuroscience Research* **3**(4-5):233-238.
- Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. (2003) *Nature* **423**:545-550.
- Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. (1976) *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* **2**(2):97-116.
- Omar NYMJ, Abas MRB, Ketuly KA, Tahir NM. Concentrations of PAHs in atmospheric particles (PM-10) and roadside soil particles collected in Kuala Lumpur, Malaysia. (2002) *Atmospheric Environment* **36**(2):247-254.
- OMS-IPCS - Environmental Health Criteria 202 - Selected non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons World Health Organisation International Programme on chemical Safety. World Health Organization, Geneva, Switzerland. (1998)
- Ortega García JA, Ferrís I, Tortajada J, Berbel Tornero O, Romero KJ, Rubalcava L, Martínez Salcedo E, Apolinar Valiente E, Crehuá Gaudiza E, Hernández Gil MD. Environmental neurotoxins (IV) Tobacco alcohol solvents fluoride food additives: Adverse effects on the fetal and postnatal nervous system Preventive measures. (2006) *Acta Pediatrica Espanola* **64**(10):493-502.

- Oskarsson A, Palminger Hallén I, Sundberg J, Petersson Grawé K. Risk assessment in relation to neonatal metal exposure. (1998) *Analyst* **123**:19-23.
- Osmond C, Barker DJP. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. (2000) *Environmental Health Perspectives* **108**(SUPPL. 3):545-553.
- Ota K, Yokoyama A. Body weight and food consumption of lactating rats nursing various sizes of litters. (1967) *Journal of Endocrinology* **38**(3):263-268.
- Otto D, Skalík I, Bahboh R, Hudnell K, Srám R. Neurobehavioral performance of Czech school children born in years of maximal air pollution [Abstract]. (1997) *Neurotoxicology* **18**:903.
- Padovan CM, Guimarães FS. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. (2000) *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**(1):79-83.
- Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S. Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. (2008) *Environmental Research* **108**:150-157.
- Palanza P, Morellini F, Parmigiani S, Vom Saal FS. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on behavioral development. (1999) *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **23**(7):1011-1027.
- Papageorgopoulou A, Manoli E, Touloumi E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of Greek towns in relation to other atmospheric pollutants. (1999) *Chemosphere* **39**(13):2183-2199.
- Park SS, Kim YJ, Kang CH. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul Korea. (2002) *Atmospheric Environment* **36**(17):2917-2924.
- Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. (2011) *Toxicology and Applied Pharmacology*, *sous presse*.
- Patchev VK, Almeida OF. Gender specificity in the neural regulation of the response to stress: new leads from classical paradigms. (1998) *Molecular Neurobiology* **16**:63-77.
- Patin V, Lordi B, Vincent A, Caston J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. (2005) *Developmental Brain Research* **160**(2):265-274.
- Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? (2004) *Developmental Brain Research* **149**(2):85-92.
- Patisaul HB, Polston EK. Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. (2008) *Brain Research Reviews* **57**(2):352-362.
- Pauluhn J, Thyssen J, Althoff J. Long-term inhalation study with benzo(a)pyrene and SO₂ in Syrian golden hamsters. (1985) *Experimental Pathology* **28**(1):31.
- Pavoni B, Salizzato M, Volpi Ghirardini A. Organic micropollutants (PCB PAH chlorinated pesticides) in sediments of venice "RII" Chemical analyses and toxicity tests using *Vibrio fischeri*. (1998) *Annali di Chimica* **88**(3-4):189-200.
- Pearce ST, Liu H, Radhakrishnan I, Abdelrahim M, Safe S, Jordan VC. Interaction of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran with estrogen receptor alpha. (2004) *Cancer Research* **64**:2889-2897.
- Pelkonen O, Nebert DW. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis. (1982) *Pharmacological Reviews* **34**(2):189-222.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. (1985) *Journal of Neuroscience Methods* **14**(3):149-167.
- Perera FP, Li Z, Whyatt R, Hoepner L, Wang S, Camann D, Rauh V. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure and child IQ at age 5 years. (2009) *Pediatrics* **124**(2):e195-e202.
- Perera FP, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, Camann D, Barr D, Bernert T, Garfinkel R, Tu Y-H, Diaz D, Dietrich J, Whyatt RM. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multi-ethnic population. (2003) *Environmental Health Perspectives* **111**:201-205.

- Perera FP, Rauh V, Whyatt RM, Tsai WY, Tang D, Diaz D, Hoepner L, Barr D, Tu YH, Camann D, Kinney P. Effect of prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. (2006) *Environmental Health Perspectives* **114**(8):1287-1292.
- Perera FP, Tang D, Tu Y-H, Cruz LA, Borjas M, Bernert T, Whyatt RM. Biomarkers in maternal and newborn blood indicate heightened fetal susceptibility to procarcinogenic DNA damage. (2004) *Environmental Health Perspectives* **112**(10):1133-1136.
- Perera FP, Wang S, Vishnevetsky J, Zhang B, Cole KJ, Tang D, Rauh V, Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons-aromatic DNA adducts in cord blood and behavior scores in New York City children. (2011) *Environmental Health Perspectives* **119**(8):1176-1181.
- Perera FP, Whyatt RM, Jedrychowski W, Rauh V, Manchester D, Santella RM, Ottman R. Recent developments in molecular epidemiology: A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. (1998) *American Journal of Epidemiology* **147**(3):309-314.
- Persson E, Larsson P, Tjälve H. Cellular activation and neuronal transport of intranasally instilled benzo(a)pyrene in the olfactory system of rats. (2002) *Toxicology Letters* **133**:211-219.
- Peters DAV. Effects of maternal stress during different gestational periods on the serotonergic system in adult rat offspring. (1988) *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **31**(4):839-843.
- Platt KL, Pfeiffer E, Petrovic P, Friesel H, Beermann D, Hecker E, Oesch F. Comparative tumorigenicity of picene and dibenz[ah]anthracene in the mouse. (1990) *Carcinogenesis* **11**(10):1721-1726.
- PNSE 1 – Plan National Santé Environnement. (2001-2004)
<http://www.developpement-durable.gouv.fr/Premier-Plan-national-sante.html>
- PNSE 2 – Plan National Santé Environnement. (2009-2013)
<http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/PNSE2-2.pdf>
- Power K, Moore C. Prenatal stress eliminates differential maternal attention to male offspring in Norway rats. (1986) *Physiology and Behaviour* **38**:667-671.
- Pritchard JB, French JE, Davis BJ, Haseman JK. The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. (2003) *Environmental Health Perspectives* **111**(4):444-454.
- Protocole à la convention sur la pollution atmosphérique transfrontière à longue distance, de 1979, relatif aux polluants organiques persistants, Aarhus (1998).
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. (2003) *European Journal of Pharmacology* **463**(1-3):3-33.
- Quadir M, Zia H, Needham TE. Toxicological implications of nasal formulations. (1999) *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents* **6**(4):227-242.
- Ramesh A, Greenwood M, Inyang F, Hood DB. Toxicokinetics of inhaled benzo[a]pyrene: Plasma and lung bioavailability. (2001) *Inhalation Toxicology* **13**(6):533-555.
- Ramesh A, Inyang F, Lunstra DD, Niaz MS, Kopsombut P, Jones KM, Hood DB, Hills ER, Archibong AE. Alteration of fertility endpoints in adult male F-344 rats by subchronic exposure to inhaled benzo(a)pyrene. (2008) *Experimental and Toxicologic Pathology* **60**(4-5):269-280.
- Ramesh A, Walker SA, Hood DB, Guillén MD, Schneider K, Weyand EH. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. (2004) *International Journal of Toxicology* **23**(5):301-333.
- Ramírez N, Cuadras A, Rovira E, Marcé RM, Borrull F. Risk assessment related to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particle phases near industrial sites. (2011) *Environmental Health Perspectives* **119**(8):1110-1116.
- Rapport de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants, 2001.
- Rattan SIS. Aging intervention prevention and therapy through hormesis. (2004) *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* **59**(7):705-709.

REACH - European Community Regulation on chemicals and their safe use ([EC 1907/2006](#)).

Rehwagen M, Müller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. (2005) *Science of the Total Environment* **348**(1-3):199-210.

Ringuette L, Jetté LP, Pouliot K. Neisseria meningitidis with reduced susceptibility to penicillin isolated from blood culture-Quebec. (1993) *Canada communicable disease report* **19**(15).

Rockens E, Dumollin J, Matheeußen C. PM10 dust and chemical characterisation of aerosols in Flanders, Belgium. (2000) *Advances in Air Pollution* **8**:699-707.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety defence and the elevated plus-maze. (1997) *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **21**(6):801-810.

Rodier PM. Environmental Causes of Central Nervous System Maldevelopment. (2004) *Pediatrics* **113**(4 II):1076-1083.

Rodriguez JW, Kirlin WG, Wirsy YG, Matheravidathu S, Hodge TW, Urso P. Maternal exposure to benzo[a]pyrene alters development of T lymphocytes in offspring. (1999) *Immunopharmacology and Immunotoxicology* **21**(2):379-396.

Rothenberg SJ, Parker RM, York RG, Dearlove GE, Martin MM, Denny KH, Lief SD, Hoberman AM, Christian MS. Lack of effects of nose-only inhalation exposure on testicular toxicity in male rats. (2000) *Toxicological Sciences* **53**(1):127-134.

Salama AK, Bakry NM, Abou-Donia MB. A review article on placental transfer of pesticides. (1993) *International Journal of Occupational Medicine and Toxicology* **2**(4):383-397.

Samanta SK, Singh OV, Jain RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. (2002) *Trends in Biotechnology* **20**(6):243-248.

Sanyal MK, Li Y-L. Deleterious effects of polynuclear aromatic hydrocarbon on blood vascular system of the rat fetus. (2007) *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology* **80**(5):367-373.

Saunders CR, Das SK, Ramesh A, Shockley DC, Mukherjee S. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. (2006) *Journal of Applied Toxicology* **26**(5):427-438.

Saunders CR, Ramesh A, Shockley DC. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. (2002) *Toxicology Letters* **129**(1-2):33-45.

Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. (2003) *International Journal of Toxicology* **22**(4):263-276.

Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. Behavioral effects induced by acute exposure to benzo(a) pyrene in F-344 rats. (2001) *Neurotoxicity Research* **3**(6):557-579.

Schettler T. Toxic threats to neurologic development of children. (2001) *Environmental Health Perspectives* **109**(SUPPL 6):813-816.

Schroeder H. Developmental brain and behavior toxicity of air pollutants A focus on the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. (2011) *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, sous presse.

Secoli SR, Teixeira NA. Chronic prenatal stress affects development and behavioral depression in rats. (1998) *Stress* **2**(4):273-280.

SFMT - Salariées enceintes exposées à des substances toxiques pour le développement fœtal. Surveillance médicale. Recommandations de la Société française de médecine du travail, novembre 2004. Référence INRS TM 3. (2005)

Sheng L, Ding X, Ferguson M, McCallister M, Rhoades R, Maguire M, Ramesh A, Aschner M, Campbell D, Levitt P, Hood DB. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon exposure leads to behavioral deficits and downregulation of receptor tyrosine kinase, MET. (2010) *Toxicological Sciences* **118**(2), art. no. kfq 304:716-731.

Sheu HL, Lee WJ. Particle size distributions of PAH content on the dry deposition materials. (1997) *Journal of Aerosol Science* **28**(SUPPL. 1):S587-S588.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. (2006) *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **21**:257-76.

- Simcik MF, Zhang H, Eisenreich SJ, Franz TP. Urban contamination of the Chicago/Coastal Lake Michigan atmosphere by PCBs and PAHs during AEOLOS. (1997) *Environmental Science and Technology* **31**:2141–2147.
- Slama R, Thiebaugeorges O, Goua V, Aussel L, Sacco P, Bohet A, Forhan A, Ducot B, Annesi-Maesano I, Heinrich J, Magnin G, Schweitzer M, Kaminski M, Charles M-A. Maternal personal exposure to airborne benzene and intrauterine growth. (2009) *Environmental Health Perspectives* **117**(8):1313-1321.
- Slikker Jr W. Principles of developmental neurotoxicology. (1994) *NeuroToxicology* **15**(1):11-16.
- Small WS. Notes on the psychic development of the young rat. (1899) *American Journal of Psychology* **11**:80-100.
- Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain VI relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. (1971) *Brain Research* **33**(2):303-314.
- Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain II Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. (1971) *Brain Research* **28**(1):85-95.
- Smith JW, Seckl JR, Evans AT, Costall B, Smythe JW. Gestational stress induces post-partum depression-like behavior and alters maternal care in rats. (2004) *Psychoneuroendocrinology* **29**(2):227-244.
- Spencer PS, Ludolph AC, Kisby GE. Are human neurodegenerative disorders linked to environmental chemicals with excitotoxic properties. (1992) *Annals of the New York Academy of Sciences* **648**:154-160.
- Stanton ME, Spear LP. Workshop on the qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity work group i report: Comparability of measures of developmental neurotoxicity in humans and laboratory animals. (1990) *Neurotoxicology and Teratology* **12**(3):261-267.
- Stein J, Schettler T, Wallinga D, Valenti M. In harm's way: Toxic threats to child development. (2002) *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics* **23**(1 SUPPL):S13-S22.
- Steiner M. Psychobiology of mental disorders associated with childbearing. (1979) *Acta Psychiatrica Scandinavica* **60**:449-464.
- Stelzner DJ. The normal postnatal development of synaptic end-feet in the lumbosacral spinal cord and of responses in the hind limbs of the albino rat. (1971) *Experimental Neurology* **31**(3):337-357.
- Stephanou P, Konstandi M, Pappas P, Marselos M. Alterations in central monoaminergic neurotransmission induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rats. (1998) *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **23**(4):475-481.
- Stephenson EH, Moeller RB, York CG, Young HW. Nose-only versus whole-body aerosol exposure for induction of upper respiratory infections of laboratory mice. (1988) *American Industrial Hygiene Association Journal* **49**(3):128-135.
- Stiller AL, Drugan RC, Hazi A, Kent SP. Stress resilience and vulnerability: The association with rearing conditions endocrine function immunology and anxious behavior. (2011) *Psychoneuroendocrinology* **36**(9):1383-1395.
- Suzuki S, Augerinos G, Black AH. Stimulus control of spatial behavior on the eight-arm maze in rats. (1980) *Learning and Motivation* **11**(1):1-18.
- Sykes SE, Cheyne JA. The effects of prenatal and postnatal protein malnutrition on physical and motor development of the rat. (1976) *Developmental Psychobiology* **9**(3):285-295.
- Takeda K, Tsukue N, Yoshida S. Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. (2004) *Environmental Sciences* **11**(1):33-45.
- Tang D, Li T-Y, Liu JJ, Chen Y-H, Qu L, Perera F. PAH-DNA adducts in cord blood and fetal and child development in a Chinese cohort. (2006) *Environmental Health Perspectives* **114**(8):1297-1300.
- Tang D, Li T-Y, Liu JJ, Zhou Z-J, Yuan T, Chan Y-H, Rauh VA, Xie J, Perera F. Effects of prenatal exposure to coal-burning pollutants on children's development in China. (2008) *Environmental Health Perspectives* **116**(5):674-679.

- Vadali M, Ramachandran G, Mulhausen J. Exposure modeling in occupational hygiene decision making. (2009) *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **6**(6):353-362.
- Van de Wiele T, Vanhaecke L, Boeckaert C, Peru K, Headley J, Verstraete W, Siciliano S. Human colon microbiota transform polycyclic aromatic hydrocarbons to estrogenic metabolites. (2005) *Environmental Health Perspectives* **113**(1):6-10.
- Van Lipzig MMH, Vermeulen NPE, Gusinu R, Legler J, Frank H, Seidel A, Meerman JHN. Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. (2005) *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**(1):41-55.
- Vardar N, Esen F, Tasdemir Y. Seasonal concentrations and partitioning of PAHs in a suburban site of Bursa, Turkey. (2008) *Environmental Pollution* **155**(2):298-307.
- Violle N, Balandras F, Le Roux Y, Desor D, Schroeder H. Variations in illumination closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. (2009) *Behavioural Brain Research* **203**:35-42.
- Virgolini MB, Bauter MR, Weston DD, Cory-Slechta DA. Permanent alterations in stress responsivity in female offspring subjected to combined maternal lead exposure and/or stress. (2006) *NeuroToxicology* **27**(1):11-21.
- vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:2056-2061.
- Wang L, Jiao J, Dulawa SC. Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. (2011) *Psychopharmacology* **216**(2):207-218.
- Wang W, Simonich SLM, Wang W, Giri B, Zhao J, Xue M, Cao J, Lu X, Tao S. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and gas/particle partitioning at background, rural village and urban sites in the North China Plain. (2011) *Atmospheric Research* **99**(2):197-206.
- Weiland K, Neidell M, Rauh V, Perera F. Cost of developmental delay from prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. (2011) *Journal of Health Care for the Poor and Underserved* **22**(1):320-329.
- Weiss B. Vulnerability to pesticide neurotoxicity is a lifetime issue. (2000) *NeuroToxicology* **21**(1-2):67-74.
- Weiss B. Sexually dimorphic nonreproductive behaviors as indicators of endocrine disruption. (2002) *Environmental Health Perspectives* **110**(SUPPL 3):387-391.
- Weiss B. Endocrine Disruptors as a Factor in Mental Retardation. (2005) *International Review of Research in Mental Retardation* **30**:195-223.
- Weiss B. Same sex no sex and unaware sex in neurotoxicology. (2010) *NeuroToxicology*, sous presse.
- Weiss B. Endocrine disruptors as a threat to neurological function. (2011) *Journal of the Neurological Sciences* **305**(1-2):11-21.
- Whyatt RM, Jedrychowski W, Hemminki K, Santella RM, Tsai W-Y, Yang K, Perera FP. Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA damage and cigarette smoke exposures in paired maternal and newborn blood samples as a measure of differential susceptibility. (2001) *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **10**(6):581-588.
- Withey JR, Shedden J, Law FCP, Abedini S. Distribution of benzo[1]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. (1993) *Journal of Applied Toxicology* **13**(3):193-202.
- Willner P. Validity reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. (1997) *Psychopharmacology* **134**(4):319-329.
- Wilson RH, DeEds F, Cox AJ. The carcinogenic activity of 2-acetaminofluorene IV Action of related compounds. (1947) *Cancer Research* **7**:453-458.

- Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B, McEwen BS. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: Prevention by lithium treatment. (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(11):3973-3978.
- Wood KA, Youle RJ. The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. (1995) *Journal of Neuroscience* **15**(8):5851-5857.
- Wormley DD, Ramesh A, Hood DB. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development plasticity and behavior. (2004) *Toxicology and Applied Pharmacology* **197**(1):49-65.
- Wu J, Ramesh A, Nayyar T, Hood DB. Assessment of metabolites and AhR and CYP1A1 mRNA expression subsequent to prenatal exposure to inhaled benzo(a)pyrene. (2003) *International Journal of Developmental Neuroscience* **21**(6):333-346.
- Wynder EL, Kaufman PL, Lesser RL. A short-term follow-up study on ex-cigarette smokers with special emphasis on persistent cough and weight gain. (1967) *American Review of Respiratory Disease* **96**(4):645-655.
- Xia Y, Han Y, Zhu P, Wang S, Gu A, Wang L, et al. Relation between urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and human semen quality. (2009) *Environmental Science and Technology* **43**:4567-73.
- Yaka R, Salomon S, Matzner H, Weinstock M. Effect of varied gestational stress on acquisition of spatial memory hippocampal LTP and synaptic proteins in juvenile male rats. (2007) *Behavioural Brain Research* **179**:126-132.
- Yang HH, Lai SO, Hsieh LT, Hsueh HJ, Chi TW. Profiles of PAH emission from steel and iron industries. (2002) *Chemosphere* **48**(10):1061-1074.
- Young EA. Sex differences and the HPA axis: implications for psychiatric disease. (1998) *The Journal of Gender-Specific Medicine* **1**:21-27.
- Zanieri L, Galvan P, Checchini L, Cincinelli A, Lepri L, Donzelli GP, Del Bubba M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area. (2007) *Chemosphere* **67**(7):1265-1274.
- Zelena D, Mergl Z, Földes A, Kovács KJ, Tóth Z, Makara GB. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. (2003) *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **285**(5 48-5):E1110-E1117.
- Zhang Y, Tao S, Shen H, Jianmin M. Inhalation exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk of Chinese population. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(50):21063-21067.

Valorisation scientifique

Publications Scientifiques

En soumission

Peiffer J, Cosnier F, Grova N, Nunge H, Salquère G, Decret MJ, Cossec B, Rychen G, Appenzeller B, Schroeder H (XXXX) Neurobehavioural toxicity of a repeated exposure to the airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon fluorene in adult wistar male rats. *Neurotoxicology*, submitted.

Domange C, Schroeder H, Violle N, **Peiffer J**, Morel A, Canlet C, Paris A, Priymenko N (XXXX) Relationships between behavioural effects and 1H NMR metabolic brain changes induced by an oral exposure in C57BL/6J mice of *Hypochoeris radicata* (L.), a neurotoxic plant for horses. *PlosOne*, submitted.

En cours de rédaction

Peiffer J, Bouillaud-Kremarik P, Strazielle C, Schroeder H (XXXX) Effect of the benzo(a)pyrene (BaP) on cytochrome oxidase and acetylcholinesterase activities in mice brain.

Chahin A, **Peiffer J**, Schroeder H, Rychen G, Guiavarc'h Y (XXXX) EROD activity induction in peripheral blood lymphocytes, liver and brain tissues of rats submitted to long term oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons.

Communications lors de congrès nationaux et internationaux

Relatives à la thèse

Peiffer J, Cosnier F, Wagner S, Decret MJ, Cossec B, Rychen G, Schroeder H (2010) Neurobehavioural toxicity of a 14-day exposure to the airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon fluorene in adult wistar male rats. *International Union of Toxicology, XII International Congress of Toxicology, 19-23 Juillet 2010, Barcelone, Espagne*. Communication affichée.

Peiffer J, Cosnier F, Wagner S, Decret MJ, Cossec B, Rychen G, Schroeder H (2010) Toxicologie neurocomportementale de l'exposition aérienne chronique au fluorène chez le rat adulte.

Séminaire de l'école doctorale RP2E, 28 Janvier 2010, Nancy, France. Communication affichée.

Peiffer J, Cosnier F, Wagner S, Decret MJ, Cossec B, Rychen G, Schroeder H (2009) Neurobehavioural toxicity of a 14-day exposure to the airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon fluorene in adult wistar male rats.

International Conference "Frontiers in Environmental Health, Late Consequences of Early Life Exposure?", 28 Octobre 2009, Belvaux, Luxembourg. Communication orale.

Peiffer J, Cosnier F, Wagner S, Decret MJ, Cossec B, Rychen G, Schroeder H (2009) Etude de la toxicité neurocomportementale du fluorène après une exposition répétée par inhalation chez le rat adulte.

Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie, 19-20 Octobre 2009, Nancy, France. Communication affichée.

Peiffer J, Morel A, Hidalgo S, Rychen G, Schroeder H (2009) Etude des effets comportementaux du fluorène administré par voie intrapéritonéale ou par voie orale pendant 28 jours chez le rat adulte.

Colloque de la Société de Circulation et Métabolisme du Cerveau, 2-3 Avril 2009, Nancy, France. Communication affichée.

Peiffer J, Morel A, Hidalgo S, Rychen G, Schroeder H (2008) Neurobehavioural toxicity of a chronic exposure to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult wistar male rats: a preliminary study about the effects of a 28 day administration using the intraperitoneal or the oral way.

International Conference "Health aspects of indoor and outdoor pollution", 12 Novembre 2008, Luxembourg Ville, Luxembourg. Communication affichée.

Relatives au Master

Peiffer J, Bouillaud-Krémarik P, Strazielle C, Schroeder H (2011) Effets d'une administration répétée dose-dépendante de benzo(a)pyrène sur les mesures conjointes de l'activité régionale de la cytochrome oxydase et de l'acétylcholinestérase dans le cerveau de la souris adulte.

Colloque annuel de la Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires, 20-21 Janvier 2011, Caen, France. Communication orale.

Peiffer J, Strazielle C, Schroeder H (2009) Investigation of the brain distribution of the neuronal cytochrome oxidase activity in adult mice submitted to a subacute benzo(a)pyrene administration.

Congrès Annuel de la Société Française de Toxicologie, 19-20 Octobre 2009, Nancy, France. Communication affichée.

Peiffer J, Strazielle C, Schroeder H (2009) Etude de la distribution régionale de l'activité de la cytochrome oxydase dans le cerveau de souris adultes exposées à une administration subaiguë de benzo(a)pyrène.

Colloque de la Société de Circulation et Métabolisme du Cerveau, 2-3 Avril 2009, Nancy, France. Communication affichée.

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

EUROTOX 2008 / 45th Congress of the European Societies of Toxicology, 5-8 Octobre 2008, Rhodes, Grèce. Toxicology Letters, 180 (suppl): S40. Communication affichée.

**Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure to the airborne Polycyclic Aromatic
Hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats**

Julie Peiffer^a, Frédéric Cosnier^b, Nathalie Grova^c, Hervé Nunge^b, Guillaume Salquère^c,
Marie-Josèphe Decret^b, Benoît Cossec^b, Guido Rychen^a, Brice M.R. Appenzeller^c, Henri
Schroeder^a

^a Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, INRA UC340, Nancy
Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b Unité de Services Inter-Laboratoires, Département Polluants et Santé, Institut National de
Recherche et de Sécurité, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^c Laboratory of Analytical Human Biomonitoring, CRP-Santé, Luxembourg Ville,
Luxembourg

Corresponding author:

Henri Schroeder

URAFPA, INRA UC340,

Faculté des Sciences et Technologies

BP239

54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cédex

France

Phone: +33 383 68 48 94

Fax: +33 383 68 48 88

henri.schroeder@scbiol.uhp-nancy.fr

www.orafpa.fr

Abstract

Fluorene is one of the most abundant polycyclic aromatic hydrocarbons in the air and may contribute to the neurobehavioral alterations induced by the environmental exposure of humans to PAHs. Since no data are available on fluorene neurotoxicity, this study was conducted in adult rats to assess the behavioral toxicity of a repeated fluorene inhalation exposure. Male rats (n=18/group) were exposed nose-only to 1.5 or 150 ppb of fluorene 6 hours/day for 14 consecutive days, whereas the control animals were exposed to a non-contaminated air. At the end of exposure, animals were tested for activity and anxiety in the open-field and the elevated-plus maze, for short-term memory in the Y-maze, and for spatial learning in the eight-arm maze. The results showed that the locomotor activity and the learning performances of the animals were unaffected by fluorene. In parallel, the fluorene-exposed rats showed a reduction of anxiety compared to controls in the open-field, but not in the elevated-plus maze, probably due to the differences that do exist in the aversive feature of the two mazes. These behavioral disturbances were correlated with the significant increase in the brain levels of the 2- and 9-OH fluorene metabolites observed at the concentration of 150 ppb. In conclusion, the present study shows the ability of a 14-day exposure to the volatile PAH, fluorene, to induce some specific anxiety-related behavioral disturbances, and argues for the vulnerability of the adult brain exposed to volatile PAHs in general and fluorene in particular.

Keywords: air pollution, polycyclic aromatic hydrocarbons, fluorene, behavior, anxiety.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent organic pollutants which are ubiquitously distributed in air, food, soil, and in various occupational settings. Whereas the ingestion of PAH-contaminated food products would be the dominant way of exposure, non-occupational inhalation of polluted air would be of great concern in places associated with a high population density level and/or a consistent rate of industrialization. From several studies (Ramirez et al., 2011; Srogi, 2007), the non-occupational levels of PAH exposure are comprised between 1 and 440 ng/m³ depending on the location of the study, the place of the sampling sites, the seasonal period of sampling, the phase investigated (gas and/or particle phases), and the number of PAHs measured in the air. PAHs are also well-known as a source of occupational exposures for significant groups of workers with levels that can reach several tens of µg/m³ (Boffetta et al., 1997; Unwin et al., 2006).

PAHs are identified to be toxic since a number of them have potent mutagenic, carcinogenic and endocrine disrupting chemicals properties (Boffetta et al., 1997; IARC, 2010; Santodonato, 1997). In contrast, the potential neurotoxicity of PAHs has received much less attention despite some human and animal evidence (for review, see Schroeder, 2011). In humans, PAH-related neurological symptoms were reported in residents living near two dumping sites in Texas (Dayal et al., 1995) or a waste oil reprocessing plant in California (Kilburn and Warshaw, 1995), and in workers of a coke processing plant in Poland (Majchrzak et al., 1990). More recently, the occupational exposure of 178 coke oven workers to BaP was demonstrated to induce alterations of both emotional and cognitive functions correlated with significant decreases in monoamine, amino acid and choline neurotransmitter levels (Niu et al., 2010). In parallel, studies performed in adult animals showed the ability of BaP and fluoranthene acutely administered to disrupt some behavioral endpoints including motor activity, responsiveness to sensory stimuli, and physiological and autonomic responses in correlation with the brain concentrations of both compounds (Saunders et al., 2003, 2002). Cognitive and anxiety-related disorders were also demonstrated in adult mice sub-acutely treated with increasing doses of BaP (0.02 to 200 mg/kg/day, 10 days, i.p.) (Grova et al., 2008, 2007). Such results were associated with concomitant dose-ranged changes in the expression of both NR1 and NR2A subunits of the NMDA glutamate receptor in regions involved in memory and anxiety. Taken all together, these observations have led to speculations about a possible relationship between neurobehavioral alterations and the exposure to environmental PAHs (Schroeder, 2011; Wormley et al., 2004).

Thus, the purpose of the present study was to develop a rodent model of PAH inhalation exposure in order to investigate the neurobehavioral toxicity of such chemicals. Among the PAHs, fluorene was used as a representative compound for the following reasons: 1) fluorene is highly volatile with air concentrations being one of the most abundant (IARC, 2010; Li et al., 2010; Ramirez et al., 2011), 2) it is used as chemical intermediate in various industrial applications, e.g., production of resins, dye stuffs, medicaments and other chemical products (IARC, 2010), 3) it is found in many environmental samples including food, tobacco smoke and industrial waste (Gmeiner et al., 1997; IARC, 2010; Kot-Wasik, 2004), and 4) fluorene is listed among the 16 PAH priority pollutants for human health by the WHO and the USEPA (USEPA, 2002). Consequently, fluorene can be considered a relevant contaminant from both occupational and general PAH atmospheric exposure. In the present study, adult male rats were assessed for their behavioral performances related to locomotor activity, learning and memory, and anxiety, after a 14-day repeated inhalation of fluorene. In addition, analyses of fluorene and 3 hydroxylated metabolites were achieved in brain samples in order to ensure the exposure of the animals to this contaminant. Finally, behavioral and physiological responses to the stressful context of the model of exposure used (exposure nose-only by placing the animals into restrained tubes) were also measured as a mean of inferring the magnitude of the stress response from the behavioral toxicity induced by fluorene, as suggested by the 403 OECD guidelines for inhalation studies (OECD, 2009).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult Wistar male rats weighing 225-250 g (8-9 weeks of age) were purchased from Harlan (Gannat, France). They were housed in a regulated environment ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$; humidity $50\pm 20\%$; light on from 3:00 a.m. to 3:00 p.m.) and subjected to a 7-day acclimatization period before study. Food (Teklad Golbal Diet 2016, Harlan, Gannat, France) and tap water were provided *ad libitum*. All rats were handled in the same way and were randomly allocated to experimental groups. All procedures were in compliance with the rules provided by the European Union (Directive 2010/63/EU).

2.2. Experimental design

Rats (n=18/group) were exposed nose-only to fluorene (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) vapor for a daily period of 6 hours over 14 consecutive days. Two levels of contamination were studied: 1.5 and 150 ppb ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $1 \text{mg}/\text{m}^3$), whereas the control animals were exposed to clean air for the same time. The lowest concentration of fluorene was calculated in order to reach in animals the level of exposure observed in humans living in urban areas (Kim et al., 2008; Zanieri et al., 2007) whereas the highest one was more relevant of an occupational exposure (Niu et al., 2010; Unwin et al., 2006). At the end of the period of exposure, 12 animals per group were used for behavioral investigations whereas the remaining 6 rats were sacrificed for biological measurements.

2.3. Fluorene inhalation exposure

Inhalation was conducted according to the 403 OECD guidelines for inhalation studies (OECD, 2009) in 200 L glass/stainless-steel chambers equipped with inhalation tubes (length: 25 cm, internal diameter: 5.5 cm) in order to ensure a strict exposure through the nasal way. Designed to sustain a dynamic and adjustable airflow ($4\text{-}5 \text{m}^3/\text{h}$), the chambers were maintained at a negative pressure of no more than $5 \text{mm}_{\text{H}_2\text{O}}$ in order to prevent any leakage of the test atmospheres. Atmospheric air was used to ventilate all the chambers. After sampling, the input air was filtered and conditioned to a temperature of $22\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and a humidity of $55\pm 10 \%$. After that, the atmosphere was contaminated by passing the total airflow over a thermoregulated solid bed of fluorene, and was checked to ensure the total absence of aerosol under these conditions of generation. Thus, fluorene contained in the atmosphere was exclusively under gaseous form. Each period of inhalation was monitored for air fluorene concentrations, temperature and relative humidity as recommended by the 403 OECD guidelines for inhalation studies (OECD, 2009).

2.4. Atmosphere sampling and analysis

Exposure levels were determined twice during the 6-hour period for 1.5 ppb, and six times for 150 ppb, by collecting atmosphere samples through glass tubes packed with Amberlite XAD-2 Polymeric Adsorbent. Fluorene was then desorbed with acetonitrile containing anthracene as internal standard ($400 \text{mg}/\text{L}$) and then analyzed on a Varian CP-3800 gas chromatograph

equipped with a flame ionization detector. Samples were separated on a 30 m x 0.53 mm (1.5 µm film thickness) CP-Sil 5 column, using nitrogen as carrier gas. The flow rate was 4 mL/min. The column temperature program was 190 °C for 4 min, increased to 235 °C at a rate of 15 °C/min and hold for 2 min. The injector (flash 1061) and the detector were maintained at 240 °C and 250 °C, respectively. Atmosphere samples of the two control chambers were also collected over the same period to ensure the absence of contamination from the air used.

2.5. Brain levels of fluorene and OH-fluorenes

The determination of fluorene and 2-, 3- and 9-OH fluorene in brain was performed according to the analytical method described by Grova et al. (submitted after corrections). Briefly, brain sample (100 mg) was homogenized with 200 µL of ultrapure H₂O, 0.1% of triton X-100 and 20 µL of internal standard mix solution (0.1 mg/mL) of fluorene-*d*10 and naphthol-*d*7 (MRI/NCI, Kansas City, Missouri, USA). Sodium acetate buffer (pH 5.6, 1 M) was added and hydrolysis was performed overnight at 37 °C using 5 µL of sulfatase (10 units/ µL) and 5 µL of glucuronidase (127 units/µL) from *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich, Bormen, Belgium). A first extraction was carried out with ethyl acetate/cyclohexane (EA/CH) (50:50, v/v). The supernatant was collected and solvents evaporated under N₂ at 37 °C. The residue was dissolved into CH and applied onto an Envi-Chrom P SPE column (Sigma-Aldrich, Bormen, Belgium) previously conditioned with CH. Fluorene and OH-fluorenes were eluted with EA/CH (50:50, v/v) and then evaporated. The residues were dissolved in 2 mL CH and 2 mL methanol-water (80:20, v/v) and the two layers were separated. The CH layer containing the fluorene was dried under N₂ and submitted to a saponification 1 h at 60 °C (1 mL alcoholic KOH 7%, w/v). Then, 2 mL ultrapure water and 2 mL EA/CH (50:50, v/v) were added. Finally, the upper phase containing the fluorene was collected and dried under N₂ until 50 µL. Thus, 1 µL was injected into the GC-MS/MS. In parallel, the methanol-water layer containing OH-fluorenes was evaporated to dryness and the extract was reconstituted in 40 µL of MTBSTFA (N-Methyl-N-(*t*-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide, 1% *t*-BDMCS, ≥ 97% purity, Sigma-Aldrich, Bormen, Belgium). The analytes were derivatized for 30 min at 60 °C and then 2 µL were injected into the GC-MS/MS. Analysis were carried out with an Agilent 7890A gas chromatograph equipped with a HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness), coupled with an Agilent 7000A triple quadrupole mass spectrometer operating in electron impact ionization mode and an Agilent CTC PAL autosampler. Detailed

of analytical conditions used for chromatography and MS/MS detection were previously described by Grova et al. (submitted after corrections). Calibration curves were performed using brain specimens supplemented with increasing concentrations of fluorene and 2-, 3- and 9-OH fluorene from 0 to 500 pg/mg of brain tissue. LODs were evaluated at 1.9 pg/mg for fluorene and ranged between 0.10 and 0.25 pg/mg for OH-fluorenes. LOQs were determined at 6.3 pg/mg for fluorene and ranged between 0.50 and 0.80 pg/mg for OH-fluorenes. Recovery ranged between 29 % and 72 % for all analytes investigated in this work. The coefficient of determination (R^2) was higher than 0.981 for all the analytes of interest.

2.6. Stress assessment

As recommended by the 403 OECD guidelines for inhalation studies (OECD, 2009), two levels of verification were carried out in the experimental design in order to discriminate the stress-related effects induced by the model of exposure from those of the contaminant: 1) two control groups were used for the present study, one being exposed through the inhalation tubes and the other one being placed within the chamber in small wirecloth enclosures leaving them to freely move in the cages, and 2) rats from the restraint-control group and the two fluorene-exposed groups were familiarized with the tubes for 6 hours/day, the previous 8 days before starting the exposure. Then, variations of stress-related markers including brain, liver and surrenal gland weights were recorded after 14 days of exposure in the 4 groups of animals whereas body weight and blood corticosterone levels were monitored at 4 predefined stages of the same period, i.e., before starting the habituation to the restraint tubes, before starting the exposure, and after 7 and 14 days of fluorene inhalation. At each stage and for each rat, blood tail samples were collected into heparinized tubes, centrifuged for 3 min at room temperature, and plasma was stored at -20 °C until used.

2.7. Corticosterone assay

Corticosterone blood levels were determined using a high-performance liquid chromatography (HPLC) method adapted from Ling and Jamali (2003). Briefly, 1 mL of ethyl acetate containing 50 µg/L of betamethasone (Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) as internal standard was added to 100 µL of plasma. The mixture was shaken vigorously for 30 s and centrifuged at 1800 x g for 10 min. The supernatant was taken, rinsed with 1 mL of NaOH 0.1 M, mixed for 30 s and centrifuged for 10 min at 1800 x g. Then, it was removed

again and evaporated until dryness. The final residue was dissolved in 300 μL of mobile phase and filtered through a 0.45 μm filter. A volume of 100 μL was injected on a Lichrospher 100 RP-18 column (150x2 mm I.D., 5 μm particle size, C.I.L. Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France). The HPLC system consisted of a Waters Alliance 2690 system coupled with a Waters 996 diode array detector with a reversed-phase. The column temperature was set at 40 $^{\circ}\text{C}$. A water/acetonitrile solution (70:30, v/v) was applied as the mobile phase at a flow rate of 0.25 mL/min. Corticosterone was detected at 245 nm wavelength and quantified over a calibration curve (corticosterone, > 99% purity, Sigma Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) spiked with betamethasone. Thus, corticosterone blood levels were calculated by their peak area ratio with the internal standard. The standard curve was obtained by injecting the same volume of solutions containing increasing amounts of corticosterone (3.5, 8.75, 17.5, 35 and 52.5 ng/mL) spiked with the same quantity of betamethasone. All the standard solutions were dissolved into the mobile phase and subjected to the same extraction procedure.

2.8. Neurobehavioral testing

2.8.1. Elevated-plus maze

Anxiety levels were assessed in the elevated-plus maze according to the protocol described by Violle et al. (2009). The maze consists of two open arms (50x10 cm, length x width) and two enclosed arms (50x10x50 cm, length x width x height) that are joined by a central platform (10x10 cm, length x width) to form a plus shape. The apparatus was 70 cm above the floor. Over a 5 min period, the rats were allowed to spend their time either in the protected part of the maze, or in the less safe open areas. Rats were placed in the central area, facing an open arm, and allowed to freely explore both parts of the maze. Standard behavioral measurements including the number of open and closed arm entries, and the time spent in both sections of the maze were quantified using The Observer XT v8.0 software (Noldus, Wageningen, The Netherlands). Additional ethological variables related to the risk assessment and exploration (number of head-dipping and rears) were also investigated (Violle et al., 2009).

2.8.2. Open-field

Activity was assessed in a circular open-field platform (diameter 1 m, maze divided in 32 squares). After a 1-min adaptation period, rats were placed individually into the maze, and their activity videotaped for 5 min. Results were expressed as total number of squares crossed,

and the number of squares visited in both peripheral, intermediate or central areas of the maze (Gould et al., 2009).

2.8.3. *Y-maze*

Immediate working memory performance was investigated by recording spontaneous alternation behavior in a Y-maze formed of 3 arms (60×10×45 cm, length x width x height) positioned at equal angles (Hughes, 2004). Rats were placed at the end of one arm and allowed to freely explore the maze for 10 min. The series of arm entries was recorded and alternation calculated as successive entries into the 3 arms on overlapping triplet sets. The percentage alternation was calculated as the ratio of present to possible alternations (defined as the total number of arm entries minus two, multiplied by 100). Otherwise, the number of arm entries and the number of rears were measured as indicators of activity.

2.8.4. *Eight-arm maze*

Rats were tested in the eight-arm maze according to the procedure described by Blaise et al. (2009). The apparatus consists of 8 arms (60×10×10 cm, length x width x height) projected each of a circular central area measuring 30 cm in diameter. Before each trial, every arm was baited with a 15 mg food pellet, and extra-maze spatial cues were placed in the testing room to allow orientation in the maze. Then, rats were tested for their spatial learning abilities once daily for 12 consecutive days. For each session, time and sequence of arm entries, and the number of errors (that corresponds to a re-entry into an already visited arm) were measured. Rats were let to explore the maze until they had either visited all eight arms or for a 15 min elapsed-time. Prior testing, rats were submitted for 3 days to one session (15 min) per day with a large amount of pellets by the end of each arm to get them used to the maze.

2.9. *Statistical analysis*

All results are expressed as mean ± S.E.M. Effects of fluorene were analyzed using a one-way analysis of variance followed by a post-hoc Dunnett t-test with the restrained control group used as the reference. The results obtained from the eight-arm maze were analyzed using a two-way analysis of variance with repeated measures on one factor. In addition, behavioral and physiological variables measured in restraint-animals were compared to those of free-exposed rats by mean of a Student t-test. The statistical analysis was performed using the SPSS 16.0 for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). Differences were

considered significant at the level of $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Atmospheric concentrations of fluorene

Over the whole period of exposure, the average concentration of fluorene in the air chamber was 1.41 ± 0.13 ppb for the lowest level of exposure, and 145.3 ± 11.2 ppb for the highest one whereas the temperature and the relative humidity were of 22.2 ± 0.3 °C and 55.6 ± 1.5 %, respectively. All these parameters were in compliance with the limits allowed by the 403 OECD guidelines for inhalation studies (OECD, 2009), and did not significantly differ from the target values. In parallel, the monitoring of air samplings in the control chambers did not show any detectable levels of fluorene.

3.2. Brain levels of fluorene and mono-hydroxylated metabolites

Fluorene was quantified in all groups and was significantly decreased in both contaminated groups compared to controls (Table 1). In the same time, only two of the three OH-fluorene metabolites analyzed were detected in the brain, namely the 9- and the 2-OH fluorene. The 9-OH fluorene was quantified in both groups and showed a significant increase only in rats exposed to 150 ppb of fluorene (Table 1). In parallel, the 2-OH fluorene was not detected in controls, reached a level near the limit of detection in 1.5 ppb fluorene-exposed rats and was significantly increased in animals inhaled with 150 ppb of fluorene (Table 1).

3.3. Physiological effects of fluorene exposure

Statistical comparisons showed no difference in body weight over the whole experimental period between fluorene-exposed animals and restrained control rats (Table 2). Moreover, no significant variations of relative brain, liver, and surrenal weights were observed between the three groups after 14 days of exposure. As a whole, corticosterone blood levels did not significantly differ from one group to another whatever the day of blood sampling (Table 2).

3.4. Behavioral effects of fluorene exposure

3.4.1. Elevated-plus maze

The total number of arm visited, the closed arm entries, and the open arm entries did not significantly differ among the groups (Table 3). When regarding the time spent in the different parts of the maze, the fluorene-exposed rats showed a significant increase in the center time whereas the closed arm time remained the same. Thus, a 14-18 % decrease of the time spent in the open arms was observed in the two fluorene-contaminated groups, but it was not significant (Table 3). In parallel, a non-significant 7-22 % decrease of the number of head-dippings performed in the open area of the maze was observed whereas the total number of head-dipps remained the same upon the groups. No significant differences were measured in the number of rears whatever the part of the maze considered.

3.4.2. Open-field

The locomotor activity assessed by the total number of crossed squares was not significantly modified by the fluorene exposure (Figure 1A) despite a slight increase of this variable by 7% and 9% in 1.5 and 150 ppb fluorene-exposed rats, respectively. This was related to the significant increase in the total number of crossed squares in the central area of the maze observed in both contaminated groups compared to the restrained control rats (Figure 1F). Moreover, animals exposed to 1.5 ppb of fluorene spent significantly more time in the same part of the maze compared to the control rats whereas the 150 ppb exposed-animals did not (Figure 1G).

3.4.3. Y-maze

Animals exposed to 1.5 or 150 ppb of fluorene did not show any learning disabilities as reflected by the same percentage of spontaneous alternation in both groups (Table 4). Moreover, fluorene had no effect on the rat activity whatever the variable measured (the total number of arms visited, the number of arms visited per minute, or the number of arms visited during the first minute of testing) (Table 4).

3.4.4. Eight-arm maze

Control animals showed an ability to learn the topography of the maze, as indicated by a significant reduction of the total number of arm entries, and the concomitant increase in the number of arms visited before the first error over the 12 days of testing (Table 5). In parallel,

the time spent to reach all eight goal arms was significantly decreased with a rising in the number of arms entered per min (Table 5). Similar behavioral performances were observed in fluorene-exposed animals whatever the concentration used (1.5 and 150 ppb), suggesting the inability of fluorene to impair the learning and memory capacities of the animals. This was confirmed by the lack of statistical differences among the 3 groups and the absence of statistical interactions between the group and the time of testing (Table 5).

3.5. Effects of the restraint stress

The body weight of the restrained control rats was significantly decreased all over the experimental period compared to the freely moving animals (Table 6). Behavioral measurements of the activity also showed a significant effect of the exposure to this stressful situation as reflected by the significant increases of the total number of squares crossed in the open-field and the total number of arm visited in the Y-maze (Table 6). Despite that, corticosterone blood levels, brain, liver, and surrenal gland weights remained the same between the two groups (Table 6). In the same way, no effects of the restraint stress were observed on anxiety- and memory-related behaviors (data not shown).

4. Discussion

The present study aimed to investigate the behavioral toxicity of fluorene which is one of the most volatile PAH through a repeated exposure to a contaminated atmosphere in a nose-only model of inhalation. Whereas several studies investigated the levels of exposure in general and occupational environments, this work is probably the first one that investigates the toxicity of the inhalation of this compound through some behavioral investigation. The experimental design of the study is original by the model of exposure used (inhalation nose-only), the use of fluorene as a representative compound of the atmospheric pollution, the levels of exposure that were calculated to correspond to different human situations of exposure, the technical ability to generate (in particular, the lowest 1.5 ppb level) and to guarantee these levels of exposure as showed by the monitoring of the contaminated atmosphere, and the measurement of the brain concentrations of this compound for which a LC-MS/MS analytical method has been developed. Moreover, the study was designed to evaluate the possible inference of the stressful context of the model of exposure in the behavioral toxicity of fluorene

4.1. Brain concentrations of fluorene and its monohydroxylated metabolites

Fluorene and its 9-OH metabolite were detected in the brain of all the animals from all the experimental groups, suggesting the difficulty to overcome the influence of the environmental pollution. Indeed, the monitoring of the atmosphere of the control chambers showed the absence of fluorene in the air whereas detectable levels were measured in parallel in the ones used to contaminate the animals. This suggests a potent source of contamination of our model like food, water or sawdust which can be contaminated over the manufacturing processes. All of these materials were tested for PAHs and were shown to be free of them down a detection limit of 1 ng/g of dried food and sawdust, and 10 ng/L of water except for fluoranthene and phenanthrene in food. Thus, another possibility may be a contamination of the animals in supplier as observed in a previous study we performed in the laboratory (Grova et al., submitted after corrections). Despite that, 2-OH fluorene, a metabolite which is considered to be a biomarker of the fluorene exposure (Amorim et al., 2009; Xia et al., 2009), was detected only in the 1.5- and the 150-exposed groups in correlation with the fluorene levels monitored in the air of the contaminated chambers. Thus, such results guaranteed the exposure of the two contaminated groups to controlled levels of fluorene in the air.

The cerebral levels of fluorene were significantly decreased in the two contaminated-groups compared to controls (Table 1), suggesting the ability of this pollutant to be metabolized by the organism. Indeed, this decrease may be related to the metabolism at the target site or in peripheral organs such as liver and lung. Most studies reported in the literature have been attached to the PAH peripheral metabolism (Shimada, 2006), all of them suggesting a role for peripheral metabolic pathways in the generation of several mono- and di-hydroxylated metabolites which could accumulate in the cerebral tissue in addition to the metabolites produced within the brain (Grova et al., 2008). In the same way, the results we obtained showed a significant increase in the 9-OH fluorene brain level only in rats exposed to 150 ppb of fluorene whereas the 2-OH fluorene level reached the limit of detection in animals exposed to 1.5 ppb of fluorene, and significantly exceeded this limit when submitted to the highest level of exposure (150 ppb). Nevertheless, the levels of these 3 OH-fluorene metabolites are not enough to explain the decrease of the parent compound, suggesting that they are probably minor metabolites, and that other mono- or di-hydroxylated metabolites are produced, maybe in higher quantities. Other metabolites were not investigated here because corresponding standards are not available on specialized market.

4.2. Behavioral toxicity of fluorene

Our results suggest the ability of fluorene to modulate the anxiety level of rats tested in the open-field and the elevated-plus maze, both of which are widely used in rodents to assess emotionality, anxiety and/or responses to stress (Gould et al., 2009; Violle et al., 2009). In the open-field, fluorene-exposed rats (1.5 and 150 ppb) were less anxious than controls as reflected by the significant increase in the number of crossed squares in the central unprotected part of the maze (Figure 1F). Concomitantly, the time spent in the same area of the maze was also increased in a significant way, but only in rats exposed to 1.5 ppb of fluorene (Figure 1G). The same reduction of anxiety was not observed in the elevated-plus maze in which the fluorene-treated rats showed a significant increase in the central place of the maze which is the zone of decision making (Viole et al., 2009), while the exploration of open arms slightly decreased (Table 3). Such discrepancies between the two mazes would be probably related to the more aversive feature of the elevated-plus maze compared to the open-field (Carola et al., 2002), and the ability of fluorene to slightly modulate the level of anxiety of the animals when exposed through the inhalation pathway. Unpublished results obtained in rats daily administered i.p. or p.o. with higher doses of fluorene (1, 10 or 100 mg/kg/day) for 28 days showed a significant reduction of the anxiety level measured in these two mazes. At final, our results are consistent with the ones we obtained with BaP in adult mice (Grova et al., 2008), and suggest the capacity of this family of pollutants to modulate the level of anxiety, depending on the molecule, the dose and the way of administration. Regarding locomotor activity and learning and memory performances, no behavioral modifications were observed in fluorene-exposed rats compared to controls, suggesting the inability of this PAH to impair the cognitive functions. In comparison, BaP and 3-methylcholanthrene were shown to disrupt the learning and memory performances in adult animals (Grova et al., 2007; Konstandi et al., 1997; Wormley et al., 2004). Thus, the absence of learning disturbances we observed with fluorene suggests a form of toxicity with this compound that is quite different from BaP or other PAHs, may be related to multiple factors including both variations in molecular structure, ways of metabolism, pharmacokinetic characteristics, and brain targets of interactions. BaP has been demonstrated to modify several functional endpoints in the brain including neuronal excitability, oxidative stress, and several neurotransmitter systems (Schroeder, 2011). Unlike BaP, little is known about the brain cellular and/or molecular toxicity of fluorene, requiring a need of testing the effects of this compound (Grandjean and Landrigan, 2006).

4.3. Effects of the restraint stress

Whereas results obtained in fluorene-exposed rats and presented above were referred to these of the appropriate restrained control animals, various behavioral and physiological markers indicative of the level of stress were investigated in freely-moving rats inhaled with clean air, and compared with those measured in the restrained animals in order to discriminate the contribution of the stressful context of the model of exposure from the behavioral toxicity of fluorene. Regarding behavior, the results of the present study showed a significant increase of the general activity of restrained animals (Table 6) whereas their level of anxiety and learning performances remained unaffected (data not shown). Contradictory results including no alterations, increase or decrease in the locomotor activity and the anxiety level of rats chronically exposed to a restraint stress have been reported (Bowman et al., 2002; Dobovicky and Jezova, 2004; Gregus et al., 2005). The same variability was also observed in various stress experiments performed in our laboratory and based on the restrained model (unpublished results). Thus, such behavioral changes could be related to the adaptation of the hypothalamo pituitary axis (HAP). Indeed, the HPA response can desensitize or remain stable especially when the same stressor is repeated (Aguilera, 1998). Thus, the corticosterone blood levels measured in the present study decreased over the period of exposure in all groups and remained every time the same between the restrained animals and the freely-moving rats, suggesting a habituated corticosterone response despite the daily exposure to the restraint stress. These results are in accordance with the ones from the study published by Narciso et al. (2003) who concluded to the full adaptation of the animals to the restraint imposed by a nose-only inhalation device after 14 days of fixed-duration daily restraint. Taken together, all these results are indicative of a non-specific influence of the stressful context of the fluorene exposure on the general activity of all restrained animals (including both control and fluorene-exposed animals). Despite that, significant behavioral disturbances were observed in fluorene-contaminated rats when compared to the appropriate restrained control animals, suggesting a specific behavioral toxicity of this compound.

5. Conclusions

The present results show the ability of a 14-day inhalation of fluorene at both environmental and occupational levels of exposure to induce some specific behavioral disturbances related to anxiety whereas the learning and memory capacities remained unaffected. Significant levels

of fluorene and two monohydroxylated metabolites were detected in the brain of the same animals, showing the ability of this compound to be metabolized and to reach the cerebral compartment. Thus, the behavioral disturbances that were observed between the control rats and the 150 ppb fluorene-exposed animals suggest a role for both the parent compound and these metabolites in the brain toxicity of this pollutant. At final, the present study contributes to demonstrate the vulnerability of the adult brain exposed to volatile PAHs in general and fluorene in particular.

Acknowledgements

We thank S. Wagner (Ph.D. student from the University of Bourgogne) for her friendly helpful assistance. This project was supported by grants from the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and from the Lorraine regional council.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Aguilera G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metabol* 1998;9:329-36.
- Amorim LCA, Dimandja JM, Cardeal ZDL. Analysis of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in urine using comprehensive two-dimensional gas chromatography with a flame ionization detector. *J Chromatogr A* 2009;1216:2900-4.
- Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourié C, et al. Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol* 2009;216:231-8.
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997;8:444-72.
- Bowman RE, Fergusson D, Luine VN. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. *Neuroscience* 2002;113:401-10.
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res* 2002;134:49-57.
- Dayal H, Gupta S, Trieff N, Maierson D, Reich D. Symptom clusters in a community with chronic exposure to chemicals in two superfund sites. *Arch Environ Health* 1995;50:108-11.
- Dubovicky M, Jezova D. Effect of chronic emotional stress on habituation processes in open field in adult rats. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1018:199-206.
- European Union Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes.
- Gmeiner G, Stehlik G, Tausch H. Determination of seventeen polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke condensate. *J Chromatogr A* 1997;767:163-9.
- Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. The open field test. *Neuromethods* 2009;42:1-20.
- Grandjean P, Landrigan P. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* 2006;368:2167-78.
- Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res* 2005;156:105-14.
- Grova N, Salquèbre G, Schroeder H, Appenzeller BMR. Determination of PAHs and OH-PAHs in rat brain by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2011, submitted after corrections.
- Grova N, Schroeder H, Farinelle S, Prodhomme E, Valley A, Muller CP. Sub-acute administration of benzo[a]pyrene (B[a]P) reduces anxiety-related behaviour in adult mice and modulates regional expression of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptors genes in relevant brain regions. *Chemosphere* 2008;73:S295-S302.
- Grova N, Valley A, Turner JD, Morel A, Muller CP, Schroeder H. Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. *NeuroToxicology* 2007;28:630-6.
- Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:497-505.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Related Industrial Exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 92. Lyon:International Agency for Research on Cancer; 2010.

Kilburn KH, Warshaw RH. Neurotoxic effects from residential exposure to chemicals from an oil reprocessing facility and superfund site. *Neurotoxicol Teratol* 1995;17:89-102.

Kim SR, Halden RU, Buckley TJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking U.S. women. *Environ Sci Technol* 2008;42:2663-7.

Konstandi M, Pappas P, Johnson E, Lecklin A, Marselos M. Suppression of the acquisition of conditioned avoidance behavior in the rat by 3-methylcholanthrene. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;56:637-41.

Kot-Wasik A. Studies on fluorene stability in different liquid media. *Anal Chim Acta* 2004;505:289-99.

Li Z, Mulholland JA, Romanoff LC, Pittman EN, Trinidad DA, Lewin MD, et al. Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. *J Environ Monit* 2010;12:1110-8.

Ling S, Jamali F. Effect of cannulation surgery and restraint stress on the plasma corticosterone concentration in the rat: Application of an improved corticosterone hplc assay. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2003;6:246-51.

.]. *Medycyna pracy* 1990;41:108-13.

Narciso SP, Nadziejko E, Chen LC, Gordon T, Nadziejko C. Adaptation to stress induced by restraining rats and mice in nose-only inhalation holders. *Inhal Toxicol* 2003;15:1133-43.

Niu Q, Zhang H, Li X, Li M. Benzo[a]pyrene-induced neurobehavioral function and neurotransmitter alterations in coke oven workers. *Occup Environ Med* 2010;67:444-8.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects / Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity; 2009.

Ramirez N, Cuadras A, Rivira E, Marcé RM, Borrull F. Risk assessment related to atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in gas and particule phases near industrial sites. *Environ Health Perspect* 2001;119:1110-6.

Santodonato J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 1997;34:835-48.

Saunders CR, Ramesh A, Shockley DC. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene. *Toxicol Letters* 2002;129:33-45.

Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. Fluoranthene-induced neurobehavioral toxicity in F-344 rats. *Int J Toxicol* 2003;22:263-76.

Schroeder H. Developmental brain and behavior toxicity of air pollutants. A focus on the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit Rev Environ Sci Tech* 2011, in press.

Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006;21:257-76.

Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Environ Chem Lett* 2007;5:169-95.

Unwin J, Cocker J, Scobbie E, Chambers H. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *Ann Occup Hyg* 2006;50:395-403.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Latest Findings on National Air Quality: 2000. Status and Trends; 2002.

Violle N, Balandras F, Le Roux Y, Desor D, Schroeder H. Variations in illumination, closed wall transparency and/or extramaze space influence both baseline anxiety and response to diazepam in the rat elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 2009;203:35-42.

Wormley DD, Ramesh A, Hood DB. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;197:49-65.

Xia Y, Han Y, Zhu P, Wang S, Gu A, Wang L, et al. Relation between urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and human semen quality. *Environ Sci Tech* 2009; 43:4567-73.

Zanieri L, Galvan P, Checchini L, Cincinelli A, Lepri L, Donzelli GP, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area. *Chemosphere* 2007;67:1265-74.

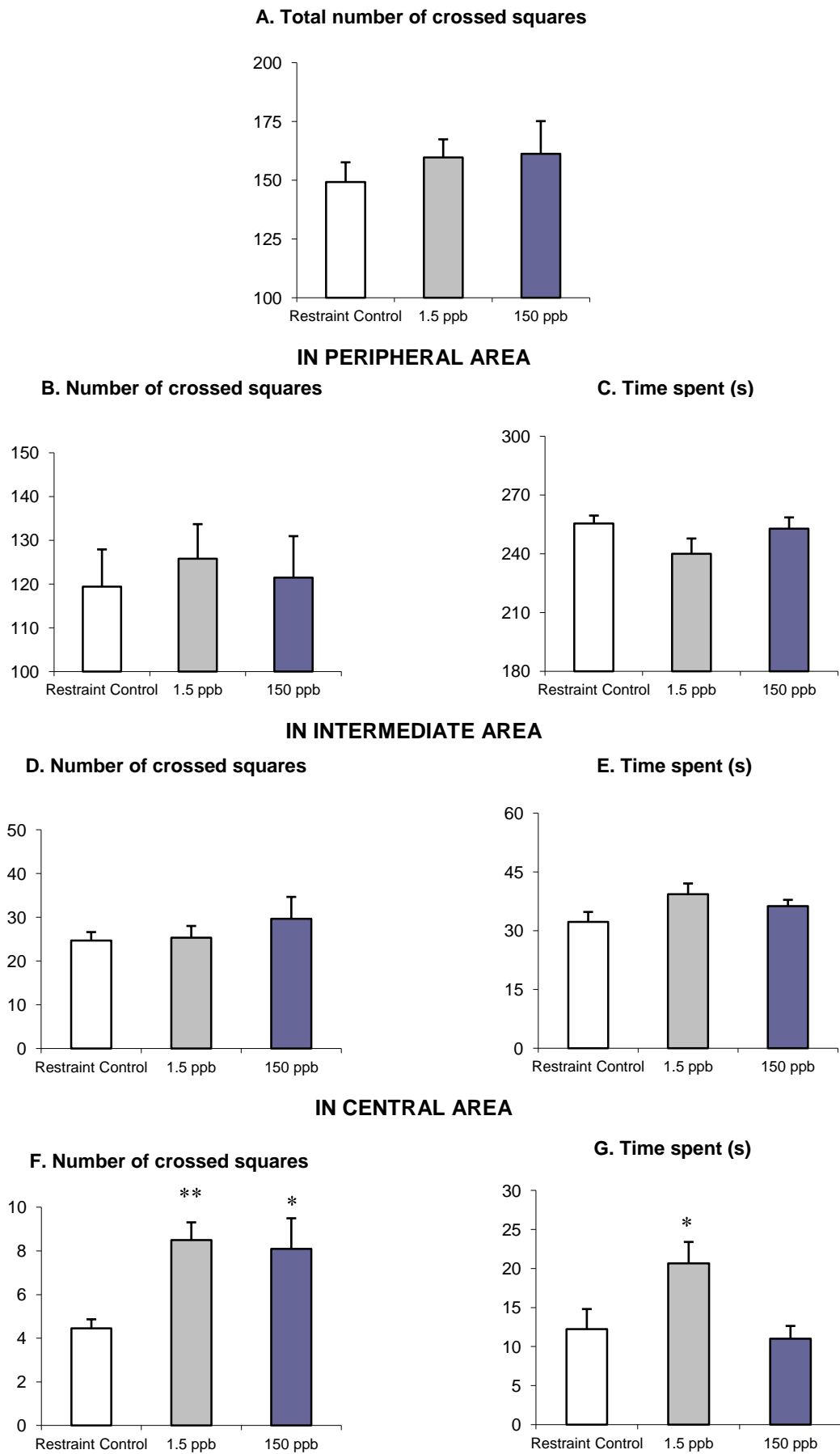


Figure 1. Effects of fluorene on locomotor activity and anxiety assessed in the open-field. Results are expressed as mean \pm S.E.M. of $n=12$ rats/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistical significant differences from restrained control rats (Dunnett's t -test from multiple comparisons).

Table 1. Brain concentrations (ng/g tissue) of fluorene and mono-hydroxylated metabolites

Variable	Σ Controls	1.5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F(2, 23)	<i>p</i>
Fluorene	33.1 \pm 1.6	21.2 \pm 3.7 **	19.8 \pm 0.3 **	13.345	<0.01
9-OH fluorene	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2 *	5.5	<0.05
3-OH fluorene	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
2-OH fluorene	n.d.	0.1 \pm 0.0	0.6 \pm 0.1 **	48.307	<0.01

Results are expressed as mean \pm S.E.M. of n=6 rats/group. Dunnett's *t*-test was used for multiple comparisons.

* : *p* < 0.05, ** : *p* < 0.01 statistical significant differences from controls

Abbreviation : n.d., non detectable

Table 2. Physiological effects of fluorene exposure

Variable	Restrained Controls	1.5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F (2, 35)	p
Body weight (g)					
<i>day before starting the habituation to the tubes</i>	246.89 ± 2.48	242.76 ± 1.61	243.83 ± 2.03	1.050	n.s.
<i>day before starting the exposure</i>	270.61 ± 2.95	265.31 ± 2.28	266.28 ± 3.24	0.954	n.s.
<i>after 7 days of exposure</i>	288.56 ± 4.10	279.12 ± 2.63	280.00 ± 3.20	2.352	n.s.
<i>after 14 days of exposure</i>	299.00 ± 4.97	286.12 ± 3.74	290.39 ± 3.83	2.394	n.s.
Relative brain weight (%)	0.60 ± 0.03	0.66 ± 0.01	0.65 ± 0.02	3.059	n.s.
Relative liver weight (%)	2.95 ± 0.05	2.83 ± 0.13	2.98 ± 0.03	0.815	n.s.
Relative surrenal gland weight (%)	0.020 ± 0.003	0.021 ± 0.002	0.020 ± 0.00	0.133	n.s.
Levels of corticosterone (ng/ml)					
<i>day before starting the habituation to the tubes</i>	248.55 ± 22.20	200.80 ± 20.67	197.80 ± 14.49	2.166	n.s.
<i>day before starting the exposure</i>	278.27 ± 15.13	272.42 ± 21.42	299.67 ± 27.71	0.420	n.s.
<i>after 7 days of exposure</i>	278.08 ± 14.37	309.92 ± 27.60	278.42 ± 15.46	0.831	n.s.
<i>after 14 days of exposure</i>	193.33 ± 15.05	215.17 ± 21.90	217.75 ± 19.77	0.492	n.s.

Results are expressed as mean ± S.E.M.

Abbreviation : n.s., not significant

Table 3. Effects of fluorene on anxiety-related behavior assessed in the elevated-plus maze

Variable	Restrained Controls	1.5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F(2, 35)	<i>p</i>
Total arm entries	15.4 ± 1.1	15.4 ± 0.8	16.8 ± 1.4	0.471	n.s.
Open arm entries	5.9 ± 0.8	5.7 ± 0.6	5.9 ± 0.6	0.047	n.s.
Closed arm entries	9.5 ± 0.7	9.8 ± 0.9	10.8 ± 0.9	0.713	n.s.
% Open arm entries	37.6 ± 3.1	37.3 ± 4.3	35.0 ± 3.1	0.167	n.s.
Open arm time (s)	87.5 ± 9.7	75.4 ± 12.7	71.7 ± 9.9	0.565	n.s.
Closed arm time (s)	148.7 ± 11.2	147.8 ± 14.8	148.8 ± 10.7	0.998	n.s.
Central area time (s)	63.8 ± 6.3	76.8 ± 5.4 *	79.5 ± 4.6 *	4.352	<0.05
Total head-dipping	7.7 ± 0.8	8.3 ± 0.9	8.2 ± 1.2	0.902	n.s.
% Head-dipping in open arms	62.3 ± 5.7	54.7 ± 7.4	40.0 ± 7.1	2.795	n.s.
Total rearing	22.5 ± 1.5	22.3 ± 2.0	25.3 ± 1.2	0.357	n.s.
% Rearing in closed arms	69.8 ± 3.5	72.4 ± 4.3	70.5 ± 2.6	0.151	n.s.

Results are expressed as mean ± S.E.M. of 12 rats/group. Dunnett's *t*-test was used for multiple comparisons.

* : *p* < 0.05 statistical significant difference from controls

Abbreviation : n.s., not significant

Table 4. Effects of fluorene on spontaneous alternation performances assessed in the Y-maze

Variable	Restrained Controls	1.5 ppb	150 ppb	ANOVA	
				F(2, 35)	<i>p</i>
% Spontaneous alternation	66.7 ± 2.4	65.3 ± 1.7	59.5 ± 3.8	1.762	n.s.
Total arm entries	32.6 ± 1.6	35.8 ± 1.3	32.5 ± 1.9	1.264	n.s.
Number of arms visited / min	3.3 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.3 ± 0.2	1.264	n.s.
Number of arm entries (1st min)	5.1 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.4 ± 0.2	0.389	n.s.

Results are expressed as mean ± S.E.M. of 12 rats/group. Dunnett's *t*-test was used for multiple comparisons.

Abbreviation : n.s., not significant

Table 5. Effects of fluorene on spatial memory performances assessed in the eight-arm maze

Group	Day 1	Day 4	Day 8	Day 12	Group of exposure		Time of testing		Group × Time	
					F(2, 35)	<i>p</i>	F(2, 35)	<i>p</i>	F(2, 35)	<i>p</i>
Total time (s)										
Restrained Controls	129.7 ± 10.6	86.2 ± 9.6	68.7 ± 4.5	76.1 ± 8.0	1.345	n.s.	20.442	**	0.525	n.s.
1.5 ppb	119.9 ± 11.7	81.7 ± 8.6	72.9 ± 4.3	69.2 ± 2.5						
150 ppb	132.0 ± 13.5	76.2 ± 3.9	69.9 ± 4.1	56.3 ± 3.2						
Total arm entries										
Restrained Controls	12.2 ± 0.7	9.8 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.4 ± 0.8	0.419	n.s.	12.396	**	0.323	n.s.
1.5 ppb	12.3 ± 1.3	9.8 ± 0.6	9.1 ± 0.3	8.5 ± 0.2						
150 ppb	12.6 ± 1.1	10.2 ± 0.6	9.3 ± 0.5	8.3 ± 0.2						
Arm entries before the 1st error										
Restrained Controls	5.8 ± 0.4	6.8 ± 0.4	6.5 ± 0.5	6.9 ± 0.5	0.503	n.s.	11.510	**	0.910	n.s.
1.5 ppb	5.4 ± 0.6	6.7 ± 0.4	7.2 ± 0.2	7.3 ± 0.3						
150 ppb	4.5 ± 0.6	6.2 ± 0.5	7.4 ± 0.3	6.8 ± 0.6						
Number of arm visited / min										
Restrained Controls	5.7 ± 0.3	7.1 ± 0.4	7.7 ± 0.2	7.3 ± 0.5	2.497	n.s.	22.901	**	0.388	n.s.
1.5 ppb	5.9 ± 0.6	7.3 ± 0.4	8.0 ± 0.3	7.6 ± 0.1						
150 ppb	6.1 ± 0.5	8.1 ± 0.4	8.1 ± 0.3	9.3 ± 0.2						

Results are expressed as mean ± S.E.M. of 12 rats/group.

** : $p < 0.01$ statistical significant variation (two-way ANOVA with repeated measures on one factor)

Abbreviation : n.s., not significant

Table 6. Effects of the restraint stress linked to the fluorene exposure device

Variable	Freely-moving rats	Restrained Controls
Physiological endpoints		
Body weight (g)		
<i>day before starting the habituation to the tubes</i>	243.22 ± 2.01	246.89 ± 2.48
<i>day before starting the exposure</i>	282.56 ± 3.45	270.61 ± 2.95 #
<i>after 7 days of exposure</i>	303.00 ± 4.56	288.56 ± 4.10 #
<i>after 14 days of exposure</i>	317.83 ± 5.41	299.00 ± 4.97 #
Relative brain weight (% b.w.)	0.59 ± 0.01	0.60 ± 0.03
Relative liver weight (% b.w.)	3.15 ± 0.09	2.95 ± 0.05
Relative surrenal gland weight (% b.w.)	0.013 ± 0.002	0.020 ± 0.003
Levels of corticosterone (ng/ml)		
<i>day before starting the habituation to the tubes</i>	299.14 ± 32.42	248.55 ± 22.20
<i>day before starting the exposure</i>	283.42 ± 16.19	278.27 ± 15.13
<i>after 7 days of exposure</i>	252.25 ± 21.91	278.08 ± 14.37
<i>after 14 days of exposure</i>	163.25 ± 30.99	193.33 ± 15.05
Behavioural measurements		
Total number of crossed cases in the open-field	117.8 ± 10.5	149.2 ± 8.1 #
Total arm entries in the Y-maze	25.3 ± 1.1	32.6 ± 1.6 ##

Results are expressed as mean ± S.E.M. of 12 rats/group.

: $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$ statistical significant differences between freely-moving animals and restrained controls

Abbreviation : b.w., body weight

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Astrid NEHLIG, Directeur de Recherche, INSERM, Strasbourg

Monsieur Guillaume GARCON, Professeur, Université de Lille

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame PEIFFER Julie

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etude de la neurotoxicité d'un Polluant Organique Persistant chez le rat : Effet à court
et à long terme de l'inhalation répétée de fluorène sur le développement sensori-moteur
du jeune et le comportement à l'âge adulte. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : **"Sciences Agronomiques"**

Fait à Vandoeuvre, le 5 Décembre 2011

Le Président de l'IN.P.L.

F. LAURENT



Etude de la neurotoxicité d'un Polluant Organique Persistant chez le rat : Effets à court et à long terme de l'inhalation répétée de fluorène sur le développement sensori-moteur du jeune et le comportement à l'âge adulte.

La pollution atmosphérique est omniprésente du fait de nombreuses sources émettrices de composés chimiques. Dans ce contexte, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont largement diffusés dans l'air et ont déjà montré des effets délétères sur la santé.

Ce travail a consisté en l'évaluation de la neurotoxicité du fluorène, composé choisi comme molécule représentative de la pollution liée aux HAP, chez le rat adulte exposé par voie *i.p.*, par voie orale ou par inhalation. Le modèle d'exposition par inhalation a ensuite été appliqué à l'étude des effets du polluant sur le développement sensori-moteur et l'activité comportementale de l'animal exposé *in utero* ou au cours de la lactation.

Ces études ont montré que le fluorène était susceptible d'affecter le niveau d'anxiété et l'activité locomotrice du rat adulte exposé directement et indirectement au polluant, et n'avait aucun effet sur les capacités d'apprentissage. En revanche, aucune atteinte majeure de la maturation des fonctions sensori-motrices n'a été mise en évidence. L'analyse de la présence du composé et de trois de ses métabolites a par ailleurs montré que le polluant était capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'être métabolisé au niveau du cerveau. Les réponses physiologiques et comportementales étant variables entre les études, les effets induits par le fluorène dépendent donc de la voie d'entrée, du niveau de contamination et du moment d'exposition.

Ces résultats ont ainsi révélé chez l'animal la toxicité comportementale du fluorène à des niveaux de contamination réalistes, confirmant ainsi le risque sanitaire de l'exposition aux HAP tout au long de la vie des individus.

Mots-clés : pollution atmosphérique, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, fluorène, voie inhalatoire, rat, neurotoxicité, développement sensori-moteur, comportement

Neurotoxicity of a Persistent Organic Pollutant in rat: short- and long-term effects of the repeated inhalation of fluorene on sensorimotor development in the offspring and behavior at adulthood.

Actually air pollution is ubiquitous due to the emission of chemical compound from many sources. In this context, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) related compounds are widely distributed in the air and have shown deleterious health effects.

Fluorene was chosen as a representative compound of PAHs pollution. This work consisted in the evaluation of its neurotoxic effects in adult animals, exposed *i.p.*, orally or by exposure nose-only. The inhalation model of exposure was then applied to the study of its effects on sensorimotor development and on behavioral activity of animals exposed *in utero* or during lactation.

The results showed that fluorene is able to induce behavioral changes in adult animals exposed directly or indirectly on the level of anxiety and the locomotor activity, whereas no effect on learning and memory abilities has been observed. However, no defect on the development of motor and sensory functions was demonstrated. Furthermore, the analysis of the presence of the compound and three of its metabolites showed that the pollutant was able to cross the blood brain barrier and can be metabolized in the brain. Moreover, variations have been observed concerning behavioral and physiological responses between studies, showing that effects induced by fluorene are dependent on the way of administration, the level of contamination and the time of exposure.

In conclusion, these results demonstrate in animals the behavioral toxicity of fluorene at levels of contamination corresponding to human cases of exposure, confirming so the risk of PAH exposure throughout life.

Keywords : air pollution, PAH, fluorene, exposure nose-only, rat, neurotoxicity, sensorimotor development, behavior